# การศึกษาความผิดปกติทางสรีรวิทยาของผลลำไย

อังคณา เปี่ยมพร้อม

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพืชสวน

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2562

# การศึกษาความผิดปกติทางสรีรวิทยาของผลลำไย

อังคณา เปี่ยมพร้อม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพืชสวน
สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

**การศึกษาความผิดปกติทางสรีรวิทยาของผลลำไย**

อังคณา เปี่ยมพร้อม

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพืชสวน

**พิจารณาเห็นชอบโดย** **อาจารย์ที่ปรึกษา**

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วินัย วิริยะอลงกรณ์)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพพร บุญปลอด)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรพินธุ์ สฤษดิ์นำ)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีรนุช เจริญกิจ)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

**สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว** .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ)
รักษาการแทนรองอธิการบดี ปฏิบัติการแทน
อธิการบดีมหาวิทยาลัยแม่โจ้
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

**ชื่อเรื่อง** การศึกษาความผิดปกติทางสรีรวิทยาของผลลำไย
**ชื่อผู้เขียน** นางสาวอังคณา เปี่ยมพร้อม
**ชื่อปริญญา** วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน
**อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วินัย วิริยะอลงกรณ์

## บทคัดย่อ

ลำไยเป็นพืชเศรษฐกิจหลักทางภาคเหนือของไทย คุณภาพผลผลิตเป็นที่ต้องการของตลาดต่างประเทศโดยเฉพาะประเทศจีน ตั้งแต่มีการค้นพบสารโพแทสเซียมคลอเรตที่ชักนำการออกดอกได้โดยไม่ต้องการอากาศหนาวเย็น ทำให้มีการขยายพื้นที่ปลูกลำไยออกไปทั่วประเทศ ทั้งที่มีคุณภาพและไม่มีคุณภาพโดยเฉพาะลำไยในทางภาคเหนือเริ่มแสดงอาการผิดปกติทางสีผิวเปลือกของผลทำให้ผลผลิตลำไยด้อยคุณภาพ งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความผิดปกติทางสรีรวิทยาของผลลำไยสายพันธุ์ดอ สาขาไม้ผลบ้านโปง อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ พบว่าลำไยมีอาการผิดปกติทางสรีรวิทยาด้านสีผิวเปลือกของผลลำไยซึ่งมีลักษณะสีผิวเปลือกค่อนข้างแดงระหว่างการเจริญเติบโตของผลลำไย ทำให้ผลผลิตลดลงการเจริญเติบโตของผลผิดปกติทำให้ลำไยไม่มีคุณภาพจึงได้วิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผลและใบลำไย พบว่า ลำไยที่ผิดปกติมีสีผิวเปลี่ยนเป็นสีแดง ผิวขรุขระการเจริญเติบโตของผลช้ากว่าลำไยปกติและพบโปรตีน 14-3-3 family (29.5 KDa) และ โปรตีน NBS-LRR protein NBSS54 (93.5 KDa) ซึ่งโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ได้แสดงออกเพิ่มขึ้นในลำไยที่ผิดปกติส่วนลำไยปกติแสดงโปรตีน acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit beta (59.5 KDa) และ transport inhibitor response 1-like (72.9 KDa) 20 และ 30 สัปดาห์หลังติดผล ในระยะ 30 สัปดาห์ พบโปรตีน 3 ชนิด ได้แก่ APX (37.4 KDa), WRKY transcription factor 72-3 (61.0 KDa) และ ramorin-4 (52.5 KDa) ที่สำคัญโปรตีน 14-3-3 family (29.5 KDa) เป็นโปรตีนที่รับรู้สารอาหาร (Nutrient sensing) จากงานทดลองนี้พบว่ามีผลต่อการขาดธาตุสังกะสีและโบรอนในใบลำไยอย่างชัดเจน

คำสำคัญ : ลำไย ความผิดปกติทางสรีรวิทยา อิเล็กโทรโฟรีซีส

**Title** THE STUDY OF PHYSIOLOGICAL DISORDER IN LONGAN FRUITS (*Dimocarpus longan* Lour.)

**Author** Miss Angkana pirmporm

**Degree** Master of Science in Horticulture

**Advisory Committee Chairperson** Assistant Professor Dr. Winai Wiriyaalongkorn

## ABSTRACT

Longan (*Dimocarpus longan,* Lour.) is a major economical crops in Northern Thailand. Based on it's quality attributes Thai longan has a good international market potential with China being the most relevant export market. Formerly, longan production depended on a cold weather stimulus for flower induction and was, thus, restricted to the Northern part of Thailand. However, off-season production is associated with a series of problems about fruit quality, especially altered undesirable skin colour. The objective of this research project was to study the morphology of longan. The study took place at Ban Bong, Sansai District, Chiang Mai Province. It was found that disorders in skin colour, making fuit reddish, caused lower yields and negatively affect the quality of the harvest. In order to identify the reasons for this the physical morphology of longan fruits and leaves was analysed. It was documented that the affected fruits exhibited a red skin colour and more rough than normal. Moreover, fruit growth was reduced. The results showed protein 14-3-3 family (29.5 KDa) and NBS-LRR protein NBSS54 (93.5 KDa) were causes longan disease. Actyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase (59.5 KDa) and transport inhibitor response 1-like (72.9 KDa). Three proteins, APX (37.4 KDa), WRKY transcription factor 72-3 (61.0 KDa) and Ramorin-4 (52.5 KDa), the protein 14-3-3 family (29.5 KDa) are nutrient sensing protein. In this study, obvious affects were zinc and boron deficiency in leaves.

Keywords : Longan; Physiological disorder; Electrophoresis

# กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วินัย วิริยะอลงกรณ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษาในการวางแผนดำเนินงานทดลอง ตลอดจนช่วยเหลือในการตรวจแก้ไขเล่มวิทยานิพนธ์จนกระทั่งสำเร็จเป็นวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพพร บุญปลอด ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรพินธุ์ สฤษดิ์นำ และ ดร.เอกวิทย์ ตรีเนตร ที่ให้ความอนุเคราะห์ทั้งในด้านการศึกษาแนวคิดตลอดจนแนะนำการแก้ไขข้อบกพร่องจนสำเร็จเป็นวิทยานิพนธ์ได้อย่างสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่สนับสนุนทุนการศึกษาระดับปริญญาโทในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อประเสริฐ เปี่ยมพร้อม และคุณแม่สมจิตร เปี่ยมพร้อม ผู้ให้กำเนิดที่มอบโอกาสในการศึกษา รวมทั้งขอขอบคุณท่านที่ไม่ได้เอ่ยนามมาในครั้งนี้ที่ค่อยช่วยเหลือตลอดระยะเวลาในการศึกษา

อังคณา เปี่ยมพร้อม

# สารบัญ

หน้า


บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

บทที่ 1 บทนำ ..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย ..... 2

ขอบเขตการศึกษา ..... 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ ..... 2

บทที่ 2 การตรวจเอกสาร ..... 3

ถิ่นกำเนิดและการแพร่กระจาย ..... 3

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของลำไย ..... 4

ธาตุอาหารพืช ..... 9

ความผิดปกติทางสรีรวิทยาของผลลำไย ..... 19

บทที่ 3 วิธีการวิจัย ..... 22

สถานที่ทำการทดลอง ..... 22

พันธุ์ลำไย ..... 22

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี ..... 22

วิธีการทดลอง ..... 22

การทดลองที่ 1.ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผล ..... 22

การทดลองที่ 2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของธาตุอาหารสังกะสีและโบรอนในใบลำไยที่ผลปกติและผลผิดปกติ(เปลือกสีแดง) ..... 23

การทดลองที่ 3. ศึกษาระดับโปรตีนเพื่อบ่งชี้อาการผิดปกติของผลลำไยปกติและผิดปกติ (เปลือกสีแดง)..... 24
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์..... 25
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ..... 38
บรรณานุกรม..... 39
ภาคผนวก..... 46
ภาคผนวก ก..... 47
ตารางภาคผนวก..... 47
ภาคผนวก ข..... 50
การสกัดตัวอย่างโปรตีน..... 50
ประวัติผู้วิจัย..... 64

# บทที่ 1
# บทนำ

ลำไยเป็นไม้ผลเขตกึ่งร้อน (subtropical fruit) อยู่ในวงศ์ Sapindaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Dimocarpus longan* Lour. (พาวิน และคณะ, 2546) และเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของไทยมีพื้นที่ปลูกที่สำคัญได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน เชียงราย พะเยา ลำปาง น่าน ตาก และมีการกระจายพื้นที่ปลูกในจันทบุรี ลักษณะทั่วไปของลำไยเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่สูง 10-20 เมตร เปลือกต้นสีน้ำตาลหรือน้ำตาลเข้ม ใบย่อยมี 3-4 ใบ ใบแก่มีสีเขียวเข้มปลายใบค่อนข้างแหลม ผลสดมีลักษณะกลมหรือเบี้ยวเล็กน้อย เปลือกผลบางมีสีน้ำตาลปนเหลือง เมื่อผลสุกเนื้อสีขาวขุ่นและค่อนข้างเหนียว มีรสหวาน มีเมล็ดสีน้ำตาลเข้มเรียบเป็นมัน 1 เมล็ดต่อผล

ตั้งแต่มีคนค้นพบสารโพแทสเซียมคลอเรตในการชักนำการออกดอกของลำไยทำให้การผลิตลำไยในประเทศไทยไม่ต้องพึ่งพาอากาศหนาวเย็นและสามารถผลิตลำไยได้ตลอดทั้งปี และทุกภูมิภาคของไทย ต่อมามีการขยายพื้นที่ปลูกออกไปทั่วประเทศผลผลิตลำไยมีคุณภาพและไม่มีคุณภาพ หลายปีที่ผ่านมาเกษตรกรประสบปัญหาเรียกว่าลำไยผลแดง โดยเปลือกลำไยเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีแดง มีผลให้ผลลำไยแคระแกร็นไม่ได้คุณภาพสร้างความเสียหายให้กับเกษตรกรระดับหนึ่งอาการดังกล่าวน่าจะเรียกว่าอาการผิดปกติทางสรีรวิทยาของผลลำไย (physiological disorder syndromes) ซึ่งเป็นอาการที่ผลลำไยมีลักษณะสีผลค่อนข้างแดงในระหว่างการเจริญเติบโตของผลลำไย ทำให้ผลของลำไยนั้นมีการหลุดร่วงลักษณะของเปลือกผลแตกไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นผลขนาดใหญ่ได้ เนื่องจากยังไม่พบสาเหตุที่แน่ชัดของความผิดปกตินี้ จึงได้ทำการศึกษาด้านต่างๆ เช่น สัณฐานวิทยาของผล การจัดการธาตุอาหารที่เกี่ยวข้องกับอาการดังกล่าว นอกจากนี้กิจกรรมการทำงานภายในเซลล์ความสำคัญของการเจริญเติบโตของพืชโดยกระบวนการเมทาบอลิซึมภายในเซลล์จะแสดงออกในรูปของการเปลี่ยนแปลงโปรตีนซึ่งน่าจะมีผลกระทบต่ออาการดังกล่าว

## วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาการเจริญเติบโตของผลลำไย ตั้งแต่ติดผลถึงเก็บเกี่ยวในลำไยที่มีลักษณะผลปกติและลำไยผิดปกติ(เปลือกสีแดง) ในระหว่างการเจริญเติบโตของผลลำไย

2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของธาตุอาหารในใบลำไยที่มีลักษณะผลปกติและลำไยผิดปกติ (เปลือกสีแดง) ในระหว่างการเจริญเติบโตของผลลำไย

3. ศึกษาระดับโปรตีนเพื่อบ่งชี้อาการผิดปกติของผลลำไยเปลือกสีแดงในระหว่างการเจริญเติบโตของผลลำไย

## ขอบเขตการศึกษา

1. ศึกษาสมบัติทางชีวภาพและตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมี ของตัวบ่งชี้ทางชีวภาพด้านโปรตีนในผลลำไยที่เป็นกลุ่มอาการความผิดปกติทางสรีรวิทยาของผลลำไยได้

2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงธาตุอาหารสังกะสีและโบรอนในใบลำไยพันธุ์ดอในอาการความผิดปกติทางสรีรวิทยาของผลลำไย

3. ศึกษาแบบแผนโปรตีนของเมล็ดลำไยพันธุ์ดอที่เป็นปกติและที่มีอาการความผิดปกติทางสรีรวิทยาของผลลำไย ด้วยเทคนิคอิเลคโตรโฟรีซีสในการแยกโปรตีนใน 2 มิติ (2-DE)

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของผลลำไย ตั้งแต่ติดผลถึงเก็บเกี่ยว ในลำไยที่มีลักษณะผลปกติและเปลือกสีแดงในระหว่างการเจริญเติบโตของผลลำไย

2. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของธาตุอาหารสังกะสีและโบรอนในใบลำไยที่มีลักษณะเปลือกสีแดงในระหว่างการเจริญเติบโตของผลลำไย

3. เพื่อศึกษาและพัฒนากระบวนการหาตัวบ่งชี้ชีวภาพด้านโปรตีนจากส่วนของเมล็ดลำไยที่มีอาการของกลุ่มอาการความผิดปกติทางสรีรวิทยาของผลลำไย

# บทที่ 2

## การตรวจเอกสาร

ลำไยจัดเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและยังเป็นผลไม้ที่ให้พลังงานสูง เพราะมีน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดคือ กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส รวมทั้งแร่ธาตุที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ (วีรชัย, 2538) พบว่าทางการแพทย์แผนจีนโบราณใช้ลำไยแห้งเป็นยาบำรุงหัวใจ บำรุงเลือด บำรุงประสาท และเป็นอาหารบำรุงกำลังจึงเหมาะสมสำหรับผู้ที่มีร่างกายอ่อนแอ

**ตารางที่ 1** คุณค่าทางอาหารของลำไย

| ข้อมูลทางโภชนศาสตร์ | ลำไยสด | ลำไยแห้ง |
|---|---|---|
| ความชื้น (%) | 81.10 | 7.80 |
| ไขมัน(%) | 0.11 | 0.04 |
| เส้นใย (%) | 0.28 | 1.60 |
| โปรตีน (%) | 0.97 | 4.60 |
| คาร์โบไฮเดรต (%) | 16.98 | 72.70 |
| ความร้อน (กิโลกรัม/100 กรัม) | 305.70 | 1,310.00 |
| แคลเซียม (มิลลิกรัม/100 กรัม) | 5.70 | 27.70 |
| เหล็ก (มิลลิกรัม/100 กรัม) | 0.35 | 2.39 |
| ฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม/100 กรัม) | 35.30 | 59.50 |
| วิตามินซี (มิลลิกรัม/100 กรัม) | 69.20 | 137.80 |
| โซเดียม (มิลลิกรัม/100 กรัม) | 3.00 | 4.50 |
| โพแทสเซียม (มิลลิกรัม/100 กรัม) | 170.00 | 2,012.00 |
| ไนอาซีน (มิลลิกรัม/100 กรัม) | - | 3.03 |
| วิตามนบี 2 (มิลลิกรัม/100 กรัม) | - | 0.375 |

ที่มา: (Tongdee, 1997)

### ถิ่นกำเนิดและการแพร่กระจาย

สันนิษฐานว่าอยู่ในประเทศจีนตอนใต้ นิยมปลูกกันมากในมณฑลฟูเกี้ยน จากนั้นได้แพร่กระจายเข้าไปสู่อินเดีย ลังกา พม่า ฟิลิปปินส์ ยุโรป สหรัฐอเมริกา สำหรับในประเทศไทยนั้นพบที่จังหวัดเชียงใหม่ แต่เดิมเป็นไม้พื้นถิ่นมีปลูกเฉพาะทางภาคเหนือของประเทศไทย เนื่องจากลำไยเป็นพืชที่ต้องการอากาศหนาวเย็นในการชักนำให้ออกดอก ต่อมาได้ค้นพบสารโพแทสเซียมครอเรตที่

สามารถทดแทนความหนาวเย็นของอากาศได้ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2541 (พาวิน และคณะ, 2547) พื้นที่ปลูกลำไยก็ได้กระจายออกไปทั่วประเทศเพิ่มมากขึ้น แม้จะมีพื้นที่ปลูกไปได้ทั่วประเทศ แต่ลำไยทั้ง 8 จังหวัดทางภาคเหนือ รวม 851,814 ไร่ เพิ่มขึ้นจากปี 2561 ร้อยละ 1.35 ผลผลิตรวม 703,335 ตัน เพิ่มขึ้นร้อยละ 4.42 แยกเป็นลำไยในฤดู 436,801 ตัน เพิ่มขึ้นร้อยละ 9 และลำไยนอกฤดูจะมีผลผลิตรวมประมาณ 266,534 ลดลงร้อยละ 2.31 ผลผลิตต่อเนื้อที่ให้ผล 826 กิโลกรัม/ไร่ เพิ่มขึ้นร้อยละ 3.12 โดยแยกเป็นลำไยในฤดู 691 กิโลกรัม/ไร่ เพิ่มขึ้นร้อยละ 10.74 และลำไยนอกฤดูประมาณ 1,213 กิโลกรัม/ไร่ ลดลงร้อยละ 11.78 ผลผลิตลำไยนอกจากจะจำหน่ายภายในประเทศแล้วยังส่งออกในลักษณะต่างๆเป็นจำนวนมาก ทั้งลำไยสด ลำไยอบแห้ง ลำไยแช่แข็งและผลิตภัณฑ์ลำไย ขณะที่ตลาดส่งออกลำไยสดที่สำคัญ ได้แก่ จีน อินโดนีเซีย ฮ่องกง เวียดนาม แคนาดา มาเลเซีย สิงคโปร์ และฟิลิปปินส์ ส่วนลำไยอบแห้งมีตลาดใหญ่ที่สุด คือ ฮ่องกง และจีน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2562)

ลำไยพันธุ์ดอเป็นพันธุ์ที่มีการออกดอกและเก็บผลผลิตก่อนพันธุ์อื่น เจริญเติบโตได้ดี ทนแล้ง เปลือกผลหนา ออกดอกติดผลค่อนข้างสม่ำเสมอ ทรงผลกลมแป้น ผิวผลสีน้ำตาล มีกระหรือตาห่าง เนื้อค่อนข้างเหนียว สีขาวขุ่น เมล็ดใหญ่ปานกลาง ลำไยพันธุ์ดอแบ่งออกตามสีของยอดอ่อนคือ พันธุ์อีดอยอดแดงและพันธุ์อีดอยอดเขียว แต่พันธุ์อีดอยอดแดงไม่ค่อยนิยมปลูกเพราะออกดอกติดผลไม่ค่อยดี ส่วนพันธุ์อีดอยอดเขียวออกดอก ติดผลง่าย นอกจากนี้ลำไยพันธุ์ดอแบ่งตามลักษณะของช่อผลคือ อีดอก้านอ่อนมีเปลือกผลบาง และอีดอก้านแข็งเปลือกผลหนาขนาดผลค่อนข้างใหญ่ความยาวประมาณ 2.5 เซนติเมตร ความกว้าง 2.6 เซนติเมตร ความหนา 2.3 เซนติเมตร และปริมาณของแข็งละลายน้ำ 18 เปอร์เซ็นต์บริกซ์ (พาวิน และคณะ, 2547)

**ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของลำไย**

ลำไยเป็นพืชเขตกึ่งร้อนอยู่ในวงศ์ Sapindaceae เดิมมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Euphoria longana* Lamk. และต่อมาได้เปลี่ยนชื่อเป็น *Dimocarpus longan* Lour. มีพืชตระกูลเดียวกับลำไยได้แก่ เงาะ (Rambutan: *Nephelium lappaceum* L.) ลิ้นจี่ (Lychee, Litchi: *Litchi chinensis* Sonn., *Nephelium litchi* Camb., *Scytalia chinensis* Gaerth., *Dimocarpus litchi* Lour.) (เกศิณี, 2546)

**ลำต้น**

ต้นลำไยมีการเจริญเติบโตเต็มที่จะมีความสูงประมาณ 12-15 เมตรหรือสูงกว่าขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และการจัดการทรงพุ่ม การเจริญเติบโต ออกดอกและติดผลขึ้นอยู่กับการจัดการสวนและ

สภาพแวดล้อมด้วย ระยะเวลาตั้งแต่ออกดอกจนถึงเก็บเกี่ยวใช้เวลาประมาณ 12-17 เดือน หลังจากเก็บเกี่ยวควรตัดแต่งกิ่งและบำรุงต้นเพื่อที่จะให้ผลผลิตในครั้งหน้าใมีคุณภาพดีด้วย (พาวิน, 2543)

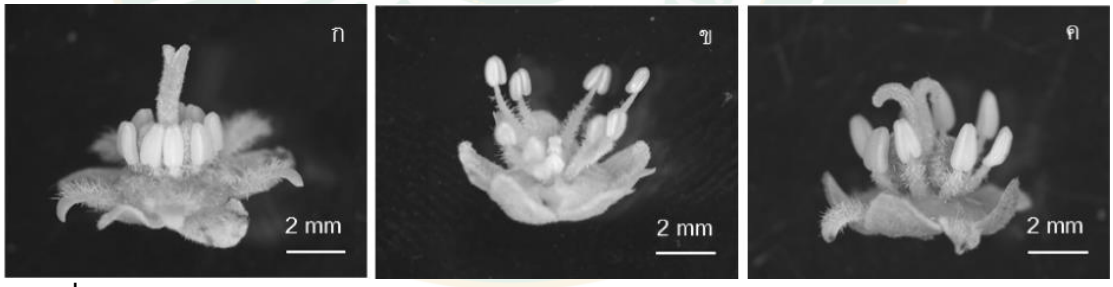
**ใบ**

ใบลำไยประกอบด้วยใบย่อยอยู่บนก้านใบรวม (pinnately compound leaves) รูปร่างใบเป็นรูปรีหรือรูปหอก ส่วนปลายใบและฐานใบค่อนข้างป้าน ขอบใบเรียบไม่หยักมีคลื่นเล็กน้อยและเห็นเส้นใบแขนง ด้านบนใบมีสีเขียวเข้มกว่าด้านล่าง ผิวด้านบนเรียบและมันมากกว่าหลังใบ (พาวิน, 2543)

**ดอก**

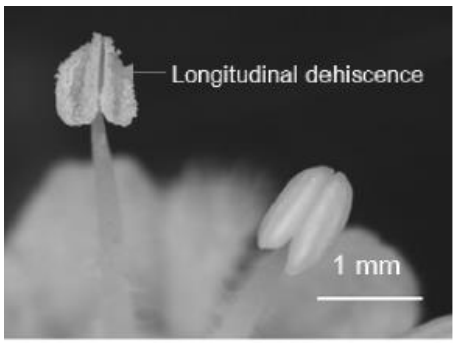
ช่อดอก (Inflorescens) ลำไยเป็นช่อดอกแบบแยกแขนง ดอกด้านล่างจะบานก่อนดอกที่อยู่ด้านบนทำให้ช่อดอกบานไม่พร้อมกัน

ชนิดของดอกลำไยประกอบด้วย 3 ชนิดคือ ดอกเพศเมีย (pistillate flower) ดอกเพศผู้ (staminate flower) และดอกสมบูรณ์เพศ (perfect flower) ดังภาพที่ 1 ทั้งสามดอกนั้นมีลักษณะคล้ายคลึงกัน คือ มีกลีบเลี้ยงจำนวน 5 กลีบ ลักษณะของกลีบเลี้ยงมีขนปกคลุม กลีบดอกมี 5 กลีบ สีขาวขุ่นมีขนาดเล็กกว่ากลีบเลี้ยง

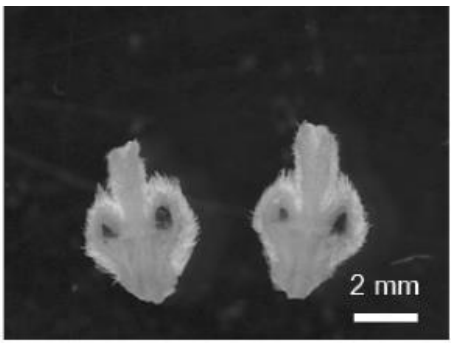



**ภาพที่ 1** ลักษณะของดอกลำไย ดอกเพศเมีย (ก) ดอกเพศผู้ (ข) ดอกสมบูรณ์เพศ (ค) (สเกล=2 มิลลิเมตร) (วัชรินทร์ และคณะ, 2559)

ดอกลำไยมีขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลาง 6.4 มิลลิเมตร และพบว่า 1 ดอกมีจำนวนเกสรเพศผู้จำนวน 8 อัน อับละอองเรณู 8 อับมีสีขาวขุ่นภายในมีอับละอองเรณู (pollen) เมื่อเจริญเต็มที่ผนังกั้นระหว่างโพรงแต่ละอันมีการแตกตามความยาวของอับละอองเรณู ดังภาพที่ 2 ในดอกเพศผู้มียอดเกสรเพศเมียและรังไข่ฝ่อดังภาพที่ 3 ส่วนปลายยอดเกสรเพศเมียแยกออกจากกัน ก้านชูเกสรเพศผู้มีความยาวมากสุด 2.4 เซนติเมตร (วัชรินทร์ และคณะ, 2559)



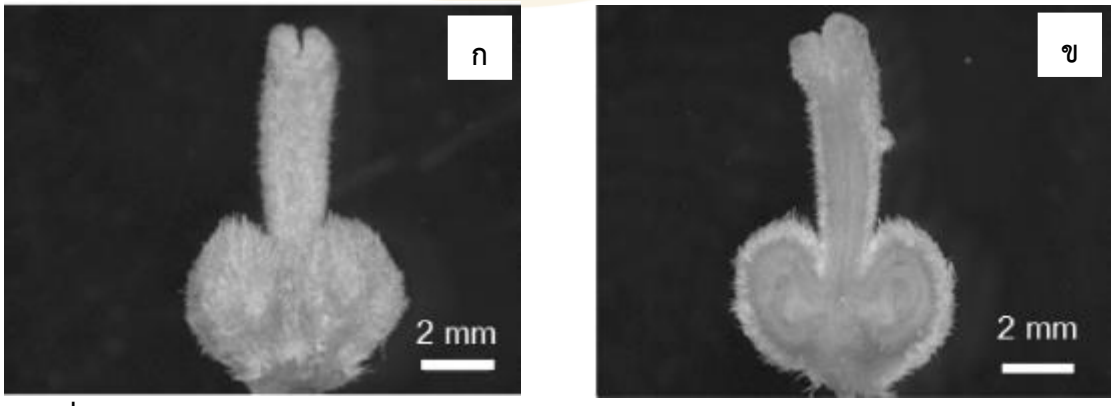

**ภาพที่ 2** ลักษณะการแตกของอับละอองเรณู (สเกล = 1 มิลลิเมตร)




**ภาพที่ 3** ลักษณะรังไข่ที่ไม่พัฒนาของดอกเพศผู้ (สเกล = 1 มิลลิเมตร)

ส่วนดอกเพศเมียมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.7 มิลลิเมตร อับละอองเรณูสีขาวขุ่น ไม่มีก้านชู อับละอองเรณูเรียงตัวรอบบริเวณรังไข่มีจำนวน 8 ละอองเรณู นอกจากนี้ยังพบว่าอับละอองเรณูไม่สามารถสร้างละอองเรณู (pollen grain) คือการเป็นหมันเมื่อรังไข่ได้ปฏิสนธิอับละอองเรณูจะแห้งและหลุดร่วง ในหนึ่งดอกแบ่งเป็น 3 ส่วนคือ รังไข่ ก้านชูเกสรเพศเมีย และยอดเกสรเพศเมียเมื่อมีการปฏิสนธิแล้วจะแยกเป็น 2 แฉกเพื่อรับละอองเรณู ก้านชูเกสรเพศเมียมีความยาวที่สุด 10.4 มิลลิเมตร ดังภาพที่ 4ก รังไข่มีลักษณะเป็นกระเปาะประกอบด้วย 2 พู แต่ละพูจะมีช่องและออวุลอยู่ภายในดังภาพที่ 4ข บริเวณด้านนอกมีขนปกคลุม ยอดเกสรเพศเมียจะบานเต็มที่พร้อมสำหรับการปฏิสนธิ

ดอกสมบูรณ์เพศเป็นดอกที่มีทั้งเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียอยู่ในดอกเดียวกัน มีขนาดรังไข่เล็ก และมียอดสั้นกว่าดอกเพศเมีย ก้านชูอับละอองมีความยาวไม่สม่ำเสมอระหว่าง 1.5-3.0 มิลลิเมตร สมารถติดผลได้แต่โดยทั่วไปจะพบในลำไยน้อยมาก อาจจะพบเพียง 1-2 ดอกต่อช่อ (วัชรินทร์ และคณะ, 2559)




**ภาพที่ 4** ลักษณะองค์ประกอบต่างๆ ของเพศเมียและการเปิดของปลายยอดเกสรตัวเมียพันธุ์ดอ (ก) รังไข่ (ข) (วัชรินทร์ และคณะ, 2559)

**การบานของดอกและการผสมเกสร**

ระยะเวลาที่เริ่มเห็นช่อดอกจนถึงดอกเริ่มบานประมาณ 3-4 สัปดาห์ ลักษณะการบานของดอกจะบานจากโคนช่อไปปลายช่อในระยะแรกของการบานของดอก ดอกเพศผู้จะบานมากกว่าดอกเพศเมียใช้เวลาบานประมาณ 1-1.5 เดือน โดยดอกจะบานอยู่สองแบบ แบบที่หนึ่งดอกเพศผู้จะบานก่อนโดยบานตั้งแต่ดอกแรกถึงดอกสุดท้ายระยะเวลา 25-28 วัน ดอกเพศเมียจะบานหลังดอกเพศผู้เริ่มบาน 14 วัน ใช้ระยะเวลาการบาน 5-7 วัน แบบที่สองดอกเพศเมียจะบานก่อนสองช่วงแต่ละช่วงใช้นะยาการบาน 4-7 วัน หลังจากดอกชุดแรกบาน 4-6 วัน ดอกเพศผู้เริ่มบานอย่างต่อเนื่อง 15-24 วัน ดอกเพศเมียที่บานเต็มที่จะมีลักษณะพร้อมรับละอองเรณู (พาวิน และคณะ, 2547)

**การติดผล**

สำหรับลำไยใช้เวลาออกดอกถึงผลแก่ประมาณ 6-7 เดือน ในปีที่มีลำไยผลดกอาหารที่สะสมจะถูกใช้ไปในปริมาณมากและลำไยมีเวลาพักฟื้นกับสะสมอาหารสั้นทำให้การติดผลในปีถัดมานั้นลำไยจะออกดอกติดผลน้อย ดังนั้นควรปลิดช่อดอกออกประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ และหลังการติดผลปลิดออก 10 เปอร์เซ็นต์ (พาวิน และคณะ, 2547)

หลังดอกบานได้ประมาณ 2 สัปดาห์จะเกิดการติดผล ดอกเพศเมียจะมีการเหี่ยวของกลีบดอกในระยะ 3-4 วัน หลังจากการถ่ายละอองเกสร ปัจจัยในการติดผลมากหรือน้อยนั้นมีดังนี้

1. ความสมบูรณ์ของต้นพืชหากต้นไม่สมบูรณ์การติดผลจะลดลง เพราะการติดผลต้องอาศัยสารอาหารเป็นจำนวนมาก หากอาหารภายในต้นไม่เพียงพอจะทำให้เกิดการแก่งแย่งอาหารกัน การหลุดร่วงของผลจึงมีสูง ดังนั้นจำเป็นต่อเตรียมความพร้อมก่อนการออกดอกเสมอ (รวี, 2540)

2. เพศและสัดส่วนของเพศดอก การที่ดอกจะเจริญเป็นผลได้ดอกเพศเมียและดอกเพศผู้ต้องเกิดการปฏิสนธิ สัดส่วนเพศดอกที่เหมาะสมถ้าจำนวนดอกเพศเมียในช่อมากโอกาสติดผลก็มีมากตามด้วย จำนวนเพศดอกทั้งสองอาจผันแปรตามสภาพต้นและสภาพแวดล้อม (พาวิน และคณะ, 2547)

3. ลำดับการบานของดอก ถ้าดอกเพศเมียบานก่อนโดยไม่มีดอกเพศผู้จากช่ออื่นภายในต้นหรือจากต้นอื่นที่บานดอกเพศเมียจะร่วงหล่นทั้งหมดเนื่องไม่มีการปฏิสนธิแต่ถ้ามีดอกเพศผู้บานและมีแมลงช่วยผสมทำให้ดอกเพศเมียบานก่อน 2 รุ่นและเกิดการติดผลอยู่ใน 2 รุ่นช่อเดียวกัน (พาวิน และคณะ, 2547)

4. แมลงผสมเกสร โดยธรรมชาติจะเกิดการผสมได้ 2 กรณี คือผสมข้ามดอกภายในต้นเดียวกันหรือผสมข้ามดอกและข้ามต้น การผสมทั้งสองกรณีจะสมบูรณ์ก็ต่อเมื่ออาศัยแมลงเป็นตัวผสมส่วนลมและแรงดึงดูดโลกนั้นอาจมีบทบาทอยู่บ้างแต่ค่อนข้างน้อย (วัฒนา, 2511) การนำผึ้งพันธุ์ *Apis mellifear* L. เข้ามาช่วยผสมในสวนลำไยอายุ 9 ปี ในระยะดอกบานเพื่อช่วยผสมเกสร พบว่าต้นลำไยติดผล 16.7 ผลต่อช่อ ส่วนต้นที่ไม่มีแมลงช่วยในการผสมเกสรติดผลเพียง 1.09 ผลต่อช่อ

(พิชัย และคณะ, 2536) สำหรับผึ้งในการผสมเกสรนั้นผึ้งจะดูดน้ำหวานจากเกสรเพศผู้ ละอองเรณูของดอกลำไยจะติดที่ขนบริเวณส่วนหัวและส่วนอกของผึ้งเมื่อผึ้งบินไปยังดอกเพศเมียละอองเกสรจะตกลงบนยอดเกสรตัวเมีย การถ่ายละอองเกสรจึงเกิดขึ้นดังนั้นจึงไม่ควรพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดแมลงในระยะที่ดอกลำไยบานเพราะจะเป็นอันตรายต่อผึ้งและแมลงชนิดอื่นๆ ที่ทำหน้าที่ช่วยในการผสมเกสรให้กับลำไย (พาวิน และคณะ, 2547)

5. สภาพภูมิอากาศ เป็นตัวแปรสำคัญต่อการติดผลลำไยแต่ถ้าเกิดความแปรปรวนของสภาพอากาศส่งผลให้ลำไยมีการเจริญเติบโตผิดปกติ เช่น การแตกใบอ่อนที่ช้าลงเนื่องจากการขาดน้ำ ฝนไม่ตกตามฤดูกาล อากาศหนาวช้าและช่วงอากาศหนาวน้อยเกินไป (วินัย, 2559) อิทธิพลของสภาพภูมิอากาศที่มีผลต่อการติดผลของลำไยมีดังนี้

5.1 อุณหภูมิ ในขณะที่ดอกกำลังพัฒนาและดอกกำลังบานอุณหภูมิของอากาศจะต้องไม่สูงหรือต่ำที่เกินไป ซึ่งมีผลต่อเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมีย (รวี, 2540) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการงอกของละอองเกสรอยู่ในระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส แต่ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส การงอกของละอองเรณูจะลดลง

5.2 ฝน หากฝนตกในขณะที่ดอกลำไยบานฝนจะไปชะล้างน้ำ ที่เป็นอาหารของละลองเกสรเพศเมีย ในขณะที่ถ่ายละอองเกสรทำให้ละอองเกสรไม่สามารถเกาะติด ยังมีผลทำให้ดอกลำไยร่วงและการผสมเกสรลดลง ในสภาวะที่มีความชื้นสัมพัทธ์สูงทำให้การปล่อยละอองเรณูช้ากว่าปกติได้ เช่นเดียวกันหากมีความชื้นสัมพัทธ์สูงตลอดทั้งวันอาจจะไม่มีการปลดปล่อยละอองเรณูและในทางตรงกันข้ามถ้าความชื้นสัมพัทธ์ต่ำหรือแห้งมากทำให้ดอกสูญเสียน้ำ ยอดเกสรแห้งและมีโอกาสหลุดร่วง (พาวิน และคณะ, 2547)

5.4 แสง ต้นลำไยใช้แสงในการสังเคราะห์ด้วยแสงจึงต้องการแสงตลอดเวลา ดังนั้นการปลูกลำไยควรปลูกในที่โล่งแจ้งถ้าหากอยู่ในที่ที่บแสงน้อยจะส่งผลให้ลำไยแทงช่อดอกได้น้อยและให้ผลผลิตน้อย นอกจากนี้แสงยังมีความสัมพันธ์กับความชื้นสัมพัทธ์หากมีแสงแดดอุณหภูมิจะสูงมากในทางตรงกันข้ามความชื้นสัมพัทธ์จะลดลง

6. โรคและแมลงศัตรู ลำไยที่เป็นโรคพุ่มไม้กวาดจะติดผลได้น้อยกว่าปกติ คือช่อดอกหนึ่งช่ออาจให้ผลผลิตเพียง 4-5 ผลต่อช่อ ในระยะการออกดอกและดอกบานถ้าเกิดการระบาดของเชื้อราผลทำให้ดอกลำไยร่วงได้ ส่วนแมลงศัตรูที่พบ เช่น เพลี้ยไฟ หนอนคืบ หนอนกินดอกลำไย หนอนม้วนใบ เพลี้ยหอยและมวนลำไยจะระบาดในช่วงลำไยแทงช่อดอกถ้ามีการระบาดมากๆ ก็มีผลทำให้ลำไยติดผลน้อยลง (พาวิน และคณะ, 2547)

7. การดูแลรักษา ในช่วงที่ลำไยออกดอกควรให้น้ำและปุ๋ยอย่างพอเพียง ถ้าลำไยขาดน้ำและปุ๋ยเป็นสาเหตุทำให้การติดผลน้อย นอกจากนี้น้ำช่วยในการละลายธาตุอาหารให้พืชนำใช้ประโยชน์ได้และช่วยทำให้พืชมีการติดผลโดยสมบูรณ์ (พาวิน และคณะ, 2547)

**การพัฒนาของผลลำไย**

การเติบโตของผลลำไยสำหรับพันธุ์อีดอใช้เวลาประมาณ 21 สัปดาห์ หลังการติดผล จึงจะโตเต็มที่ (ดาวเรือง, 2530) การเติบโตของผลลำไยแบ่งออกเป็น 3 ระยะดังนี้

ระยะที่ 1 ตั้งแต่สัปดาห์ที่เริ่มติดผลถึงสัปดาห์ที่ 10 ระยะนี้เป็นการพัฒนาของเปลือกและเมล็ด เมื่ออายุผลประมาณ 6 สัปดาห์มีการเจริญเติบโตช้าๆ

ระยะที่ 2 สัปดาห์ที่ 10-21 หลังการติดผลในระยะผลลำไยมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะเนื้อของผลจะเจริญเติบโตในสัปดาห์ที่ 8-14 หลังจากนี้เมล็ดจะมีขนาดโตเกือบเต็มที่

ระยะที่ 3 สัปดาห์ที่ 21 เป็นต้นไปจะเป็นช่วงระยะที่มีการเจริญเติบโตของผลช้าลงเพราะเนื้อและเมล็ดลำไยมีการเจริญเติบโตเกือบคงที่ (พาวิน และคณะ, 2547)

**ขนาดของผล**

โดยทั่วไปขนาดของผลอยู่ในช่วง 2.4-3.5 เซนติเมตร (ขนาดผลขึ้นอยู่กับสายพันธุ์) น้ำหนักผล 10-20 กรัมต่อผล

**การแตกของผล**

ผลแตกหรือ fruit cracking เกิดจากการขยายตัวของเนื้อกับเปลือกที่มีการเจริญเติบโตไม่สมดุลกัน ในส่วนของเนื้อผลเป็นเซลล์อ่อนนุ่มมีความยืดหดตัวได้มาก ขณะเปลือกมีความยืดหยุ่นต่ำกว่าส่วนเนื้อถ้าเปลือกมีพัฒนาการที่ไม่ดีการขยายเพื่อรองรับเนื้อไม่ได้จึงเกิดการดันและเปลือกแตก สำหรับการแตกของผลเกิดขึ้นได้กับต้นที่มีผลดก ผิวเปลือกบาง สาเหตุเกิดจากการขาดน้ำ แร่ธาตุอาหารในระยะเริ่มการพัฒนาของเปลือกส่งผลให้เปลือกผลพัฒนาไม่ดีเมื่อถึงระยะการสร้างเนื้อผลจึงเกิดแรงดันขึ้น เมื่อเปลือกขยายไม่ทันจึงเกิดอาการแตกของผล การแตกของผลมักจะเกิดระยะที่ผลลำไยใกล้เก็บเกี่ยวการป้องกันควรให้น้ำอย่างสม่ำเสมอตั้งแต่ระยะออกดอกจนกระทั่งเก็บเกี่ยว (พาวิน และคณะ, 2547)

**ธาตุอาหารพืช**

ธาตุอาหารมีบทบาทในกระบวนการเมแทบอลิซึม เมื่อพืชขาดธาตุอาหารจะเกิดการชะงักการเจริญเติบโตของพืชได้ ธาตุอาหารพืชที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชพิจารณาได้ดังนี้

1. ถ้าพืชขาดธาตุอาหารแล้วจะแสดงอาการผิดปกติ
2. ธาตุอาหารมีหน้าที่เฉพาะเจาะจง ไม่สามารถทดแทนกันได้
3. ธาตุอาหารเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึม เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ หรือเป็นสารประกอบในเมแทบอลิซึม (ศุภลักษณ์, 2549)

การที่พืชจะนำไปใช้ประโยชน์ได้นั้นต้องอยู่ในรูปที่พืชใช้ประโยชน์ได้คือ ต้องมีโครงสร้างโมเลกุลที่สามารถแตกตัวเป็นอนุมูลหรือไอออนละลายน้ำได้พร้อมให้พืชนำไปใช้ได้ทันที ส่วนรูปแบบธาตุอาหารที่พืชใช้ประโยชน์ไม่ได้ต้องผ่านการย่อยสลายให้มีขนาดเล็กเมื่อพืชดูดธาตุเข้าไปแล้วพืชจะเปลี่ยนเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่จำเป็นต่อพืชแต่บางส่วนยังคงอยู่ในรูปไอออนอิสระในเซลล์พืชเพื่อกระตุ้นเอนไซม์ เช่น โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม แมงกานีส สังกะสี ทองแดง และคลอรีน บางธาตุเป็นตัวควบคุมความสมดุลในเซลล์พืช เช่น โพแทสเซียมและคลอรีน (ศุภลักษณ์, 2549)

**การจำแนกธาตุอาหารพืช**

ธาตุอาหารพืชจำแนกได้หลายวิธีเช่น ปริมาณที่พืชใช้ บทบาทของธาตุอาหารในเมแทบอลิซึม และความเหมาะสมในด้านนิเวศวิทยา

ธาตุอาหารพืชแบ่งได้เป็น 2 จำพวกตามปริมาณที่พืชต้องการคือ ธาตุอาหารมหัพภาค (macronutrient element) และธาตุอาหารจุลภาค (micronutrient element)

ธาตุอาหารมหัพภาคหรือธาตุอาหารหลัก เป็นธาตุที่พืชต้องการในปริมาณมากได้แก่ คาร์บอน (C), ไฮโดรเจน (H), และออกซิเจน (O), ไนโตรเจน (N), ฟอสฟอรัส (P), โพแทสเซียม (K), แคลเซียม (Ca), แมกนีเซียม(Mg) และกำมะถัน (S)

ธาตุอาหารจุลภาคหรือธาตุอาหารรอง เป็นธาตุที่พืชต้องการในปริมาณน้อยแต่มีประโยชน์ต่อพืชได้แก่ โบรอน (B), คลอรีน (Cl), ทองแดง (Cu), เหล็ก (Fe), แมงกานีส (Mn), โมลิบดินัม (Mo) และสังกะสี (Zn) (ยงยุทธ, 2546)

**หน้าที่ของธาตุอาหารหลัก**

คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เป็นองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และสารประกอบอินทรีย์อื่นๆเป็นองค์ประกอบของกลุ่มคาร์บอกซิลิกทำปฏิกิริยาในกระบวนการชีวเคมีพื้นฐานทั้งภายในพืช

**ธาตุไนโตรเจน** พืชมีธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ 2-5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง จะอยู่ในคลอโรพลาสต์ของพืชในลักษณะเป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโน โปรตีน กรดนิวคลีอิก และเอนไซม์ต่างๆ การดูดใช้ธาตุไนโตรเจนในรูปไนเทรตไอออน ($NO_3^-$) และแอมโมเนียมไอออน ($NH_4^+$) โดยปกติพืชจะดูดไนเทรตมากกว่าแอมโมเนียม สำหรับยูเรียพืชจะดูดในดินโดยตรงแต่สารนี้มีอยู่ในธรรมชาติน้อยพืชดูดใช้มากเฉพาะในกรณีที่มีการใส่ปุ๋ยยูเรียสังเคราะห์เท่านั้น

**อาการขาดไนโตรเจน** แสดงอาการที่ใบอ่อนมีสีเหลืองไม่สม่ำเสมอทั้งเนื้อใบและเส้นใบ

**ธาตุอาหารฟอสฟอรัส** พืชมีฟอสฟอรัสอยู่ประมาณ 0.3-0.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง พืชจะดูดในรูปของไฮโดรเจนฟอสเฟตไอออน ($H_2PO_4^-$) เป็นส่วนใหญ่ ถ้าการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรตมาก

พืชจะดูดฟอสฟอรัสมากขึ้น การเคลื่อนย้ายเกิดขึ้นทั้งในท่อน้ำและท่ออาหารส่วนใหญ่จะเคลื่อนไปที่ใบอ่อนเพื่อสร้างสารประกอบอินทรีย์ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต (ศุภลักษณ์, 2549)

**อาการขาดฟอสฟอรัส** มีการเปลี่ยนแปลงอยู่ 2 ประการคือ ใบขยายช้าลงและจำนวนใบน้อยลงสาเหตุเพราะชั้นผิวไม่ค่อยขยายตัวเมื่อฟอสฟอรัสที่ผิวใบต่ำและการดูดน้ำของรากลดลง แต่ปริมาณและคลอโรฟิลล์ต่อหน่วยพื้นที่ใบลดลงเพียงเท่านั้นจึงทำให้ใบมีสีเขียวเข้มแต่อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงลดลง (ยงยุทธ, 2546) การขาดฟอสฟอรัสทำให้คาร์โบไฮเดรตลงมาอยู่ที่รากด้วยเหตุนี้รากพืชที่ขาดฟอสฟอรัสยังสามารถยืดหดตัวได้ในขณะที่ส่วนเหนือดินชะงักการเจริญเติบโตแล้วแสดงว่าพืชรักษาสภาพให้รากมีความสามารถหาธาตุอาหารที่ขาดแคลนมาเพิ่มเติม (Smith *et al.,* 1990)และการขาดธาตุนี้ยังส่งผลกระทบต่อการเจริญพันธุ์เช่น ออกดอกช้า จำนวนผลและเมล็ดน้อยลง (Barry *et al.,* 1989)

**ธาตุอาหารโพแทสเซียม** พืชต้องการในปริมาณมาก ไม่มีองค์ประกอบของอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ในพืชจึงอยู่ในเซลล์พืชในรูปไอออนอิสระ ($K^+$) ที่ละลายน้ำได้เคลื่อนย้ายในต้นพืชได้ดีจะเคลื่อนย้ายจากใบแก่ไปยังเนื้อเยื่อเจริญ และอยู่ในท่ออาหารถึง 80 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณไอออนบวกในท่ออาหารและช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรตและการหายใจ ควบคุมการเปิด-ปิดของปากใบ ควบคุมการเต่งของเซลล์ (ศุภลักษณ์, 2549)

**อาการขาดธาตุโพแทสเซียม** พืชจะเหี่ยวเฉาง่ายเมื่อความชื้นในดินที่มีอยู่จำกัดจึงไม่มีความต้านทานต่อการขาดน้ำเหมือนพืชที่มีโพแทสเซียมเพียงพอ พืชที่ขาดธาตุนี้มักเป็นโรคง่ายเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์และปริมาณอินทรีย์สารมีผลทำให้พืชนั้นอ่อนต่อเชื้อโรค (Marschner, 1995)

**ธาตุอาหารแคลเซียม** เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช ทำให้เนื้อเยื่อพืชและต้นพืชคงความแข็งแรง ซึ่งพืชใบเลี้ยงคู่ต้องการแคลเซียมมากกว่าพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและถูกควบคุมโดยพันธุกรรม การดูดซึมแคลเซียมเกิดบริเวณปลายรากเท่านั้นทำให้มีความสัมพันธ์กับอัตราการคายน้ำส่งผลให้ถ้าพืชดูดมีการคายน้ำน้อยการดูดซึมรากก็น้อยลงด้วย การที่ทำให้การเจริญของรากหยุดการชะงัก เช่น การระบายน้ำได้ไม่ดี อุณหภูมิต่ำ เป็นต้น พืชจะดูดแคลเซียมผ่านท่ออาหารไปยังส่วนต่างๆของพืช (ศุภลักษณ์, 2549)

**อาการขาดธาตุแคลเซียม** พืชที่ขาดจะแสดงอาการที่บริเวณเนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโตมีทั้งปลายราก ยอด ตา และช่อดอก โดยจะแสดงอาการแห้งตายเป็นสีดำอาการที่พบบ่อยคืออาการก้นดำของผลมะเขือเทศและพริกหวาน อาการยอดดำในผักกาดหอมและยอดอ่อนที่แห้งตายรากสั้นหนาออกดอกน้อยในพืชตระกูลถั่ว (ศุภลักษณ์, 2549)

**ธาตุอาหารแมกนีเซียม** ส่วนมากอยู่ในหินและแร่เมื่อสลายตัวจะปลดปล่อยแมกนีเซียมออกมา นอกจากนี้ยังมีแมกนีเซียมอยู่ในรูปแบบของไอออนอิสระในสารละลายดินซึ่งมีจำนวนน้อยกว่ามากเมื่อเทียบกับในรูปแคตไอออนแลกเปลี่ยนได้ แมกนีเซียมที่อยู่ในดินมี 3 รูปคือ

1. แมกนีเซียมไอออนในสารละลายดิน

2. แมกนีเซียมแลกเปลี่ยนได้ซึ่งดูดซับอยู่กับผิวคอลลอยด์ดิน พืชสามารถนำไปใช้ได้ทั้งสองรูปนี้เป็นประโยชน์ได้ง่าย

3. เป็นองค์ประกอของเกลือและแร่ธาตุในดินการปลดปล่อยแมกนีเซียมขึ้นอยู่กับสภาพละลายได้ของเกลือกับความยากง่ายของสลายของแร่ ความเป็นกรด-ด่างของดินมีอิทธิพลต่อความเป็นประโยชน์ในดินมาก ไม่ว่าจะเป็นกลางหรือด่างการดูดแมกนีเซียมของพืชมีปฏิปักษ์กับ $K^+$, $NH_4^+$, $Ca^{2+}$, $MN^{2+}$ และ $H^+$ หากในดินมีความเข้มข้นสูงจะทำให้อัตราการดูดแมกนีเซียมลดลง (ยงยุทธ, 2546)

**อาการขาดแมกนีเซียม** จะแสดงอาการที่ใบแก่ก่อนเนื้อใบสีเหลืองแต่เส้นใบยังสีเขียว และฐานใบยังคงสีเขียวเป็นรูปสามเหลี่ยมจากนั้นใบจะร่วง (ศุภลักษณ์, 2549) หากพืชขาดแมกนีเซียมในช่วงแรกๆ และได้รับการแก้ไขอาจไม่ทำให้ผลผลิตลดลงแต่ใบพืชที่มีการขาดจะมีการสะสมแป้งมากขึ้นทำให้การสังเคราะห์ด้วยแสงมีน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการย่อยแป้งในคลอโรพลาสต์ (ยงยุทธ, 2546)

**ธาตุอาหารกำมะถัน** อยู่ในรูปของซัลเฟตไอออน ($SO_4^{2-}$) แล้วลำเลียงขึ้นส่วนบนของพืช เป็นส่วนประกอบของกรดอะมิโนคือ ซิสเตอีนและเมไทโอนีนมีความจำเป็นต่อการสังเคราะห์โปรตีน และส่วนประกอบของโคเอนไซม์เอมีบทบาทในการเคลื่อนย้ายหมู่เอซิล ธาตุกำมะถันยังเป็นส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยพบในกระเทียม หอม กุยช่ายเป็นต้น มีองค์ประกอบของกำมะถันอยู่ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ยังมีบทบาทในการสังเคราะห์ด้วยแสง (ศุภลักษณ์, 2549)

**อาการขาดธาตุกำมะถัน** พืชที่ขาดมีการเปลี่ยนแปลงด้านเมแทบอลิซึมดังนี้ กระบวนการสังเคราะห์โปรตีนถูกยับยั้งมีการะสมสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนที่ละลายได้ในสัดส่วนที่มาก และมีการสะสมไนเทรตเมื่อเพิ่มปุ๋ยซัลเฟตแก่พืชที่ขาดธาตุกำมะถัน พบว่าปริมาณซัลเฟตในเนื้อเยื่อเพิ่มขึ้นและมีการสังเคราะห์โปรตีนได้น้อยลงจึงส่งผลต่อคลอโรฟิลล์ในใบอาการที่ปรากฏคือใบแก่และใบอ่อนจะเหลือง (Freney *et al.,* 1978)

**หน้าที่ของธาตุอาหารรอง**

**ธาตุอาหารรอง** เป็นกลุ่มธาตุที่พืชมีความต้องการน้อยแต่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช หากขาดแคลนธาตุใดธาตุหนึ่งพืชอาจจะชะงักการเจริญเติบโตได้

**ธาตุอาหารคลอรีน** มีมากในธรรมชาติทั้งในดิน น้ำ และอากาศ คลอลีนละลายได้ง่ายในน้ำฝนที่ตกลงมาในแต่ละช่วงฤดูฝนคลอรีนในดินมีปริมาณสูงกว่าความต้องการพืช พืชสามารถดูดใช้ได้

อย่างรวดเร็วในปริมาณมากจึงพบอาการเป็นพิษมากกว่าอาการขาดธาตุคลอรีนต่อการสังเคราะห์ด้วยแสงการสะสมคลอรีนพบในคลอโรพลาสต์มากกว่า คลอรีนช่วยในแมงกานีสอยู่ในสภาพออกซิไดส์ที่เหมาะต่อการปลดปล่อยออกวิเจนในปฏิกิริยาฮิลล์ของระบบแสง II คลอรีนต่อการเปิดปิดปากใบแม้ว่าธาตุโพแทสเซียมมีบทบาทหลักแต่พืชก็ต้องการคลอรีนมาช่วยควบคุมไอออนในเซลล์พืชเพื่อให้มีความสมดุลของปากใบ (ศุภลักษณ์, 2549)

**อาการขาดธาตุคลอรีน** พืชจะเหี่ยวง่าย ใบมีสีซีด และมีบางส่วนแห้งตาย พืชที่ปลูกในดินปูนจะไม่แสดงอาการขาดอย่างชัดเจน แต่ถ้าเพิ่มคลอรีนจะช่วยให้การเจริญเติบโตได้ดีขึ้นตามลำดับจนมีธาตุนี้ในเนื้อเยื่อไม่เกิน 10 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง (Singh *et al.,* 1990)

**ธาตุอาหารทองแดง** เป็นส่วนประกอบของโปรตีนพลาสโทไซยานินทำหน้าที่เคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนจากระบบแสง II ไปยังระบบแสง I โดยในคลอโรพลาสต์มีทองแดงอยู่ 50 เปอร์เซ็นต์ และเป็นองค์ประกอบของเอมไซม์ยังมีบทบาทในเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต บทบาทในการสร้างลิกนินเพราะทองแดงเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสมีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารฟีนอลเป็นสารตั้งต้น (ศุภลักษณ์, 2549)

**อาการขาดธาตุทองแดง** ที่ชัดเจนในพืชยืนต้นคือ ต้นแกร็น ใบอ่อนบิดเบี้ยว เยื่อเจริญที่ยอดตาย ใบอ่อนสีซีดเหลืองและปลายกิ่งแห้งแล้วลุกลามใบที่โคนกิ่ง (Robson *et al.,* 1981) อาการที่อาจพบได้คือใบอ่อนเหี่ยวเพราะท่อน้ำ (xylem) มีลิกนินไม่เพียงพอจึงทำให้การลำเลียงน้ำไปยังส่วนอื่นๆได้น้อยและไม่เพียงพอหรือผนังเซลล์ของใบอ่อนนั้นไม่แข็งแรงเนื่องจากมีการสะสมแคลเซียมน้อย เมื่อพืชขาดทองแดงทำให้การเคลื่อนย้ายแคลเซียมไปยังใบอ่อนน้อยลงมีผลต่อการสร้างผนังเซลล์ไม่สมบูรณ์ (Brown, 1979)

**ธาตุหล็ก** พืชดูดใช้ในรูปของเฟอร์รัสไอออน ($Fe^{2+}$) หรือคีเลตเป็นส่วนใหญ่ การดูดธาตุเหล็กจะแข่งขันแมงกานีส ทองแดง แคลเซียม แมกนีเซียม โพแทสเซียม และสังกะสี ทำให้พืชมีการขาดธาตุเหล็กแม้ว่าปริมาณเหล็กในดินเพียงพอแล้ว ธาตุนี้เคลื่อนย้ายในท่ออาหารได้น้อยหน้าที่สำคัญคือเป็นส่วนประกอบของคลอโรพลาสต์ โปรตีนและเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์หลายชนิด

**อาการขาดธาตุเหล็ก** ใบพืชจะมีอาการเหลืองซีดและมีขนาดเล็กหยุดการพัฒนาคลอโรพลาสต์ จะแสดงอาการที่ในอ่อนก่อนถ้าการขาดธาตุรุนแรงใบที่เกิดใหม่อาจเป็นสีขาว มักพบในดินด่างหรือดินที่มีฟอสฟอรัสสูง (ศุภลักษณ์, 2549)

**ธาตุแมงกานีส** มีสารละลายในรูปของแมงกานีสไอออน ($Mn^{+2}$) มีบทบาทสำคัญในการเคลื่อนย้ายในท่ออาหาร และเป็นส่วนประกอบของแมงกาโนโปรตีนในระบบแสง II ของกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง แมงกานีสยังช่วยป้องกันคลอโรพลาสต์จากพิษได้

**อาการขาดธาตุแมงกานีส** จะแสดงที่ใบอ่อนก่อนใบจะซีดเหลืองระหว่างเส้นใบ เนื้อใบเป็นจุด พบได้ในดินทราย ดินด่าง อาการจะแสดงรุนแรงในอากาศแห้งและเย็น (ศุภลักษณ์, 2549)

**ธาตุอาหารโมลิบดินัม** เป็นสารเร่งปฏิกริยาในการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ซึ่งมีความจำเป็นในพืชบางชนิด พืชตระกูลถั่วที่อยู่ร่วมกับแบคทีเรียไม่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาใช้ได้ในเมื่อขาดโมลิบดินัม นอกจากนี้ยังมีความสำคัญในการสร้างโปรตีนบทบาทและหน้าที่ของธาตุโมลิบดินัมในพืชนั้น จึงทำให้การทำงานของธาตุไนโตรเจนในพืชสมบูรณ์ขึ้นนอกจากนี้ยังจำเป็นสำหรับกระบวนการสร้างสารสีเขียวและน้ำย่อยภายในพืชบางชนิดด้วย

**อาการขาดธาตุโมลิบดินัม** จะแสดงอาการที่ใบแก่ก่อนเนื่องจากการเคลื่อนย้ายในต้นพืชได้ปานกลาง ใบแสดงอาการเหลืองสม่ำเสมอทั้งเนื้อใบและเส้นใบคล้ายอาการขาดธาตุไนโตรเจนแต่การขาดโมลิบดินัมจะเกิดการตายของเนื้อเยื่อตามขอบใบ (ศุภลักษณ์, 2549)

**ธาตุโบรอน** เป็นธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตของพืช โดยพืชต้องการในปริมาณที่น้อยมากและมีความแตกต่างกันออกไปตามชนิดพืช

**หน้าที่ของโบรอนในพืช** โบรอนที่พืชดูดซึมขึ้นไปใช้ประโยชน์ในรูปของกรดบอริก ($H_3BO_3$) เป็นหลัก โบรอนเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นอย่างมากต่อการเจริญเติบโตของพืชทุกชนิดที่มีท่อลำเลียงอาหาร (vascular plants) ส่วนพืชชั้นต่ำ เช่น เชื้อรา หรือสาหร่ายน้ำจืด ดูเหมือนว่าพืชเหล่านี้ไม่มีความต้องการโบรอน (Marschner, 1986) สำหรับกลุ่มธาตุอาหารพวกจุลธาตุซึ่งเป็นกลุ่มธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณน้อยต่อการเจริญเติบโตของพืชถ้ามีปริมาณมากเกินไปจะทำให้เกิดความเป็นพิษโดยมีช่วงความแตกต่างที่น้อยมากสำหรับโบรอนเป็นธาตุอาหารเพียงธาตุเดียวที่ให้ผลตอบสนองสูงมากเมื่อให้พืชในปริมาณที่น้อยแต่เมื่อใส่โบรอนในปริมาณที่สูงกว่าอัตราแนะนำแม้เพียงเล็กน้อยก็ตามโบรอนจะทำให้เกิดความเสียหายได้ (Davidescu *et al.*, 1982)

ลักษณะการดูดโบรอนของรากพืช ไอออนที่เคลื่อนย้ายจากสารละลายดินหรือสารละลายอาหารเข้าสู่รากจะทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์กลุ่มที่มีประจุลบในผนังเซลล์ ถึงแม้ปฏิกิริยานี้อาจมีผลต่อการดูดใช้ไอออนเข้าไปสู่ภายในรากพืชแต่ลักษณะการดูดไอออนของรากพืชถูกกำหนดโดยเยื่อ membrane ที่ไอออนผ่านโดยเฉพาะเยื่อ plasma membrane คุณสมบัติเยื่อ membrane มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาแต่สมบัติทางเคมีและกายภาพของไอออนโดยเฉพาะขนาดและวาเลนซีของไอออนเป็นตัวกำหนดอัตราการถ่ายเทไอออนผ่านเยื่อ membrane องค์ประกอบของเยื่อ membrane โดยเฉพาะ phospho และ sulfolipids และโปรตีนมีส่วนที่เป็นกลุ่มที่มีประจุไฟฟ้าไอออนจึงทำปฏิกิริยากับกลุ่มเหล่านี้ตามกฎโดยทั่วไปความรุนแรงของปฏิกิริยานี้เพิ่มขึ้นตามลำดับ (Marschner, 1986)

การดูดธาตุโบรอนของพืชสัมพันธ์กับ pH และความเข้มข้นของธาตุนี้ในสารละลายเมื่อพืชดูดแล้วก็เคลื่อนย้ายสู่ส่วนเหนือดินทางท่อน้ำ ต่อจากนั้นก็สามารถเคลื่อนย้ายทางท่ออาหารได้ด้วย

การศึกษาบทบาทของโบรอนมีความยุ่งยากกว่าธาตุอาหารจุลภาคอื่นๆ เนื่องจากธาตุนี้ไม่ได้เป็นองค์ประกอบในเอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่งโดยเฉพาะข้อมูลที่ได้จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทาง

สรีระเมื่อพืชขาดโบรอน ความบกพร่องด้านสรีระและชีวเคมีที่พบคือ การสร้างเซลล์ การสังเคราะห์ลิกนิน โครงสร้างเซลล์เมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต RNA IAA ฟีนอล วิตามินซี และการหายใจ ข้อมูลยังไม่ชัดเจนว่าเป็นผลทางอ้อมของธาตุนี้

อย่างไรก็ตามบทบาทที่เด่นชัดเจนของโบรอนมีสองด้านคือ การสังเคราะห์และสร้างความสมบูรณ์ให้ผนังเซลล์ อันเนื่องจากการสังเคราะห์สารเชิงซ้อนโบรอนกับสารเพกทิน และบรูณภาพของเยื่อเกี่ยวข้องกับการรวมตัวของโบรอนกับไกลโคลิพิดในเยื่อ (Shelp, 1993)

ปริมาณโบรอนในพืชเป็นค่าที่บอกถึงปริมาณโบรอนที่พืชดูดขึ้นมาใช้ โดยทั่วไปปริมาณธาตุอาหารในพืชอาจบอกได้เป็น 2 รูปแบบคือ บอกเป็นความเข้มข้นของธาตุอาหารหรือบอกเป็นปริมาณธาตุอาหารที่พืชดูดขึ้นทั้งหมด ในกรณีหลังนี้เป็นปริมาณธาตุอาหารทั้งหมดที่พืชสามารถดูดขึ้นมาใช้แล้วเก็บไว้ในต้นพืชหากเป็นอย่างกรณีแรกความเข้มข้นของธาตุอาหารจะขึ้นกับน้ำหนักแห้ง ในทางปฏิบัติจึงนิยมบอกความเข้มข้นของธาตุอาหารในเนื้อเยื่อส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช เมื่อได้ปริมาณโบรอนในพืชแล้วนำมาเปรียบเทียบกับค่าวิกฤติซึ่งค่าวิกฤติเป็นค่าปริมาณโบรอนในพืชหรือส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชที่บอกสถานะภาพของโบรอนในพืชนั้นๆ (เพิ่มพูน, 2546)

**บทบาทของโบรอนที่มีต่อการเจริญเติบโตของพืช**

1. พืชดูดธาตุอาหารโบรอนในรูปแบบของกรดบอริคและในรูปของบอเรทอิออนผ่านทางระบบราก ผ่านทางท่อน้ำเช่นเดียวกับแคลเซียมอิออน

2. พืชต้องการโบรอนในปริมาณน้อยแต่ขาดไม่ได้เพราะพืชต้องการเจริญเติบโตและยังพบว่าโบรอนมีส่วนสำคัญในกระบวนการสร้างโปรตีน แป้ง กระบวนการหายใจของพืช และกระบวนการสร้างฮอร์โมนต่างๆ ของพืช

3. โบรอนมีส่วนสำคัญในการพัฒนาเซลล์ของพืช ถ้าขาดโบรอนเซลล์ของพืชจะไม่พัฒนา

4. โบรอนมีส่วนสำคัญในกระบวนการสร้างแป้งและน้ำตาล กระบวนการออกดอก กระบวนการเคลื่อนย้ายฮอร์โมนพืชต่างๆ ถ้าพืชขาดโบรอนจะทำให้ดอกและติดผลลดลง

5. โบรอนจะช่วยเคลื่อนย้ายแป้งและน้ำตาลจากใบไปสู่ผล ถ้าขาดโบรอนแป้งและน้ำตาลก็จะถูกสะสมมากไว้ที่ใบพืชจะทำให้ใบหนาและสีเขียวเข้ม

6. โบรอนมีส่วนสำคัญช่วยให้เซลล์ของพืชยาวขึ้น พืชที่ขาดโบรอนจะเกิดจุดขาวด่างที่ใบและขอบใบจะเป็นสีน้ำตาลม้วนงอและแห้งตายในที่สุด

7. โบรอนช่วยในการสังเคราะห์ด้วยแสงเพื่อสร้างแป้งและน้ำตาล พืชที่ขาดโบรอนจะทำให้ผนังเซลล์ของท่ออาหารเปราะบางในหัวมันฝรั่ง ถ้าขาดโบรอนเวลาผ่าจะเกิดสีน้ำตาลที่เนื้อเร็วขึ้นซึ่งไม่เหมาะสำหรับกระบวนการอุตสาหกรรม (ในผลไม้บางชนิดก็แสดงอาการเช่นนี้) พืชที่ขาดโบรอน

จะทำให้กระบวนการสร้างกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ลดลง กรดนิวคลีอิกมีส่วนสำคัญในการพัฒนาเซลล์พืช

8. โบรอนช่วยเสริมสร้างวิตามินบี 1, วิตามีนซี, ไบโอตินและแคโรทีนในผลไม้ พืชต้องการโบรอนมากในช่วงออกดอกเพื่อสร้างความแข็งแรงของท่อเกสรดอก (pollen tube) และกระบวนการผสมเกสรของดอก (pollination)

9. โบรอนมีความสำคัญในการติดผล (fruit setting) ในพืชตระกูลถั่ว โบรอนมีความสำคัญในกระบวนการสะสมไนโตรเจน (nitrogen fixation) ในปมราก (nodule)

10. โบรอนช่วยให้พืชมีความทนทานต่อสภาพอากาศหนาวเย็น

**อาการขาดธาตุโบรอนในพืช**

ลักษณะการขาดธาตุอาหารของโบรอนที่พืชแสดงออกนั้น จะแสดงออกที่ส่วนอ่อนที่สุดของพืช เพราะโบรอนเป็นธาตุที่ไม่เคลื่อนย้ายในพืช อาการที่พืชขาดโบรอนมีดังนี้

1. ทำให้ยอดหรือส่วนที่อ่อนที่สุดของพืชชะงักการเจริญเติบโต จึงทำให้พืชแคระแกรนและยอดที่ชะงักการเจริญเติบโตนี้จะมีสีแดงหรือสีเหลือง

2. เกิดจุดสีน้ำตาลหรือดำในส่วนต่างๆ ของพืชโดยเฉพาะพืชหัว (Root crop) กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก กะหล่ำปม และพืชตระกูลกะหล่ำอื่นๆ

3. เกิดเป็นจุดสีน้ำตาลหรือเป็นดวงสีน้ำตาลคล้ายๆ อาการโรค Cankers หรือ Lesions ปรากฏอยู่ภายในส่วนต่างๆ ของพืชโดยเฉพาะพืชหัว และพวกไม้ผล เช่น ส้ม แอปเปิล นอกจากนั้นยังพบว่า ส้มมีเปลือกหนาผิดปกติอีกด้วย

4. พืชตระกูลถั่วจะเกิดคลอโรซีสที่ใบ ส่วนพวกเซอเลอรี่จะมีลำต้นแตกเป็นร่อง พืชที่ใช้หัวที่รากหัวก็แตกเป็นร่อง และไม้ผลก็มีผลแตก ส่วนไม้ยืนต้นไม้พุ่มรวมทั้งไม้ดอกจะมีอาการซึ่งสังเกตได้คือ ตาที่ยอดอ่อน (terminal bud) แห้งและตายไป

5. ทำให้เซลล์ในเนื้อเยื่อเจริญฉีกขาดและการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อในกลุ่มท่อลำเลียง (Vascular tissue) ไม่เป็นปกติและเกิดเนโครติกที่ท่อน้ำ (xylem) และท่ออาหาร (phloem)

6. ข้าวโพดจะเกิดคลอโรซีส ถ้าขาดตอนต้นฤดูจะเป็นอันตรายต่อการออกดอกเพศผู้ และเพศเมีย การติดฝัก และละอองเรณูจะมีลักษณะผิดไปจะพบในใบแก่เกิดการเหลืองบริเวณกลางใบถึงยอดและที่ใบอ่อนไหวต่อการเป็นพิษของโบรอน ได้แก่ สตรอเบอรี่ องุ่น ถั่ว ฝ้าย เป็นต้น (Usahakaset, 2548)

หากพืชขาดโบรอนผลกระทบทางตรงและทางอ้อมที่เกิดขึ้นในระยะเจริญพันธุ์คือ ดอกไม่สมบูรณ์ ละอองเรณูเป็นหมัน ยอดเกสรเพศเมียไม่พร้อมที่จะรับละอองเรณู ละอองเรณูไม่งอก การงอกของหลอดเรณูภายในก้านเกสรเพศเมียไม่สมบูรณ์จึงไม่ปฏิสนธิทำให้ไม่มีเมล็ดหรือติดผล

เมล็ดไม่พัฒนาจึงเป็นเมล็ดลีบ (Dell *et al.,* 1997) และทำให้ผนังเซลล์มีความยืดหยุ่นลดลง (Hu *et al.,* 1996 ) ธาตุโบรอนมีหน้าที่ควบคุมการสะสมสารฟินอลิกและควิโนนไม่ให้มากจนเป็นอันตรายต่อเซลล์และช่วยลดปริมาณของอนุมูลอิสระ เช่น ออกซิเจนรูปที่เป็นพิษและมีฤทธิ์ทำลายโครงสร้างของเยื่อเมื่อพืชได้รับแสงที่มีความเข้มข้นสูง (Cakmak *et al.,* 1997)

อาการขาดธาตุโบรอนในมะละกอเกิดขึ้นในช่วงระยะออกดอกและให้ผลผลิต อาการที่เด่นชัดคือ รูปทรงผิดปกติบิดเบี้ยว ผิวไม่เรียบถ้าอาการรุนแรงมากจะมีน้ำยางสีขาวไหลออกมาและเมื่อผ่าดูข้างในจะพบเมล็ดสีน้ำตาลปนขาวและเมล็ดลีบ นอกจากนี้น้ำหนักผลยังลดลงกว่าปกติ (มงคล และคณะ, 2546)

อาการขาดธาตุโบรอนในมะม่วงเกิดขึ้นในช่วงระยะการเจริญเติบโตของผลส่งผลให้ผลมะม่วงแตกและการขาดธาตุโบรอนทำให้เกิดความผิดปกติทางสรีรวิทยาในช่วงการพัฒนาผลมะม่วงอาการที่เห็นได้ชัดคือ การพัฒนาสีเขียวส่วนปลายของผลและการเกิดสีน้ำตาลในเมล็ดและเนื้อเยื่อชั้นกลางของเปลือกผลมะม่วง (Sarun *et al.,* 2011) นอกจากนี้สภาวะที่ทำให้ขาดธาตุโบรอนคือ สภาพภูมิอากาศสูงหรือแดดจัดส่งผลให้ขาดธาตุโบรอนได้และยังทำให้คุณภาพผลผลิตต่ำ การตอบสนองของธาตุโบรอนที่พ่นในมะม่วงพบว่าการใช้ธาตุโบรอนที่พ่นทางใบมีการตอบสนองดีกว่าการใช้ทางดิน (Somanahalli *et al.,* 2005)

**สภาพแวดล้อมที่พืชขาดธาตุโบรอน**

โบรอนเป็นธาตุที่สามารถซึมผ่านดินได้ง่ายกว่าธาตุอื่นๆ โบรอนมักมีข้อบกพร่องกับพื้นที่ที่มีปริมาณน้ำฝนสูงและสภาพดินที่เป็นกรดเนื่องจากโบรอนสามารถละลายน้ำได้มากจึงมีการชะล้างลงไปที่ใต้รากของพืช นอกจากนี้การทำงานของโบรอนจะลดลงภายใต้สภาวะแห้งแล้งส่งผลให้ความเป็นด่างของดินเพิ่มขึ้น ดินที่ระดับอินทรียวัตถุต่ำมีแนวโน้มที่จะขาดธาตุโบรอนเพราะเมื่ออินทรียวัตถุสลายตัวโบรอนจะถูกปลดปล่อยออกมาด้วย (Marschner, 1995) พืชที่กำลังแตกกิ่งก้านหรือกำลังออกดอกส่งผลให้พืชขาดโบรอนได้ง่าย (Dear *et al.,* 2004)

**ธาตุสังกะสี**

ธาตุสังกะสีมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์โปรตีนและการแสดงออกของยีนในพืช (Cakmak, 2010) พบว่าการทำหน้าที่ต่างๆ ของโปรตีนในพืชต้องการธาตุสังกะสีในการทำหน้าที่ร่วมด้วย (Andreini *et al.,* 2006) และสังกะสียังทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ร่วมในการทำหน้าที่ของเอนไซม์ชนิดต่างๆมากกว่า 300 ชนิดในพืช (Coleman, 1998) และที่สำคัญธาตุสังกะสีในพืชยังมีบทบาทสำคัญในการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการงอกอีกด้วย (Cakmak *et al.,* 1993)

การสังเคราะห์โปรตีนมีกรดอะมิโนและอะไมด์ (amides) เหลือตกค้างและสะสมอยู่มากกว่าปกติ การขาดสังกะสีทำให้การสังเคราะห์โปรตีนลดลงเนื่องจากสาเหตุ 3 ประการคือ

1. สังกะสีเป็นองค์ประกอบสำคัญของเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส (RNA polymerase) เอนไซม์หนึ่งโมเลกุลต้องมีสังกะสี 2 อะตอม เมื่อดึงธาตุนี้ออกไปกิจกรรมของเอนไซม์จะแยกออก

2. สังกะสีมีบทบาทในการช่วยให้ไรโบโซมดำรงโครงสร้างที่ดีไว้ได้ อาร์เอ็นเอไรโบโซมในเซลล์ของยูกลีนาปกติมีสังกะสี 650-1280 ไมโครกรัม ในอาร์เอ็นเอหนึ่งกรัมแต่ถ้าขาดธาตุนี้ไรโบโซมจะแตกสลายแต่กลับมารวมกันใหม่เมื่อได้รับธาตุอาหารนี้เพียงพอ (Prask *et al.,* 1971)

3. พืชที่ขาดสังกะสี RNA จะสลายตัวเร็วกว่าปกติเนื่องจากเมื่อขาดธาตุนี้กิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสจะสูงขึ้น เอนไซม์นี้เร่งปฏิกิริยาไฮดรอไลซีสของอาร์เอ็นเอเมื่อเพิ่มสังกะสีให้พืชอย่างเพียงพอกิจกรรมของไรโบนิวคลีเอสก็ลดลง ขณะเดียวกันปริมาณโปรตีนในพืชก็สูงขึ้น การขาดธาตุสังกะสีมีผลต่อเอนไซม์รวดเร็วมากเนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวลดลงก่อนที่จะมีอาการขาดธาตุนี้ปรากฏให้เห็น (Johnson *et al.,* 1979)

**การขาดธาตุสังกะสีในพืช**

พืชอาจขาดธาตุสังกะสีทั้งในดินกรดที่สลายตัวอย่างมาก (highly weathered acid soils) และดินปูน ในกรณีที่สองพืชอาจมีอาการขาดสังกะสีผสมผสานกับอาการขาดธาตุเหล็ก การขาดธาตุสังกะสีในดินมีสาเหตุจากดินมีค่าความกรด-ด่างสูง ความเป็นประโยชน์ของสังกะสีจะลดลง เนื่องจากไอออนของธาตุนี้ดูดซับกับดินเหนียวหรือแคลเซียมคาร์บอเนต ส่วนที่อยู่ในรูป $Zn(OH)_2$ และ $ZnCO_3$ นั้นละลายได้เล็กน้อย อีกสาเหตุคือสารละลายดินมีไบคาร์บอเนตไอออน ($HCO_{-4}$) สูง ซึ่งมีอิทธิพลยับยั้งการดูดสังกะสีที่รากและการเคลื่อนย้ายจากรากสู่ส่วนเหนือดิน คล้ายกับอิทธิพลของไบคาร์บอเนตไอออนต่อเหล็กแม้ธาตุอาหารหลักจะเป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการปริมาณมากเมื่อเทียบกับธาตุอาหารรองแต่การได้รับธาตุอาหารรองปริมาณต่ำกว่าความต้องการสามารถทำให้พืชแสดงอาการขาดธาตุและส่งผลต่อการเจริญเติบโตได้ ดังนั้นการรักษาความสมดุลระหว่างธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง ทั้งนี้การขาดธาตุอาหารรองมักจะพบในดินที่ไม่ผ่านการเพาะปลูกมาก่อน บริเวณผิวดินที่มีระดับน้ำสูงพื้นที่ที่เป็นดินทรายและดินด่าง (Zekri *et al.,* 2003)

การใช้สังกะสีแก่พืชโดยวิธีการใส่ปุ๋ยทางดินหรือฉีดพ่นทางใบในดินที่ขาดธาตุสังกะสีพบว่าสามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของพืชและผลผลิตได้ (Rengel *et al.,* 1995) ธาตุสังกะสีที่มีอยู่ในดินสามารถนำมาใช้ได้โดยตรง ทั้งที่อยู่ในรูปสารประกอบอินทรีย์และอนินทรีย์ เช่น ZnO, ZnEDTA และ Zn-oxysulfate นอกจากนี้ยังพบว่า ธาตุสังกะสีที่อยู่ในรูปสารประกอบซัลเฟต ($ZnSO_4$) นำมาใช้อย่างแพร่หลายเช่นกัน เนื่องจากสามารถละลายน้ำได้ดีและมีราคาถูก (Ishimaru *et al.,* 2011) ในดินที่ขาดธาตุสังกะสีพบว่าการใส่ปุ๋ยทางดินร่วมกับการฉีดพ่นทางใบสามารถเพิ่มผลผลิตเมล็ดและ

ปริมาณความเข้มข้นของธาตุสังกะสีในเมล็ดได้ดีมากกว่าการใส่ทางดินเพียงอย่างเดียว เนื่องจากพ่นทางใบพืชสามารถนำกลับไปใช้ได้อย่างรวดเร็วเทียบกับการให้ทางดิน (Cakmak, 2010) ในบรรดาธาตุอาหารรองธาตุสังกะสีเป็นธาตุที่ขาดมากที่สุดในไม้ผลเช่น ทุเรียนและมังคุด ในทุเรียนอาการขาดธาตุสังกะสีที่พบคือใบมีขนาดเล็ก สีเขียวอ่อนหรือมีจุดสีเหลือง ขอบใบหยัก ในมังคุดจะพบใบเรียวเล็กกว่าปกติ ใบหนาแข็งกระด้าง พื้นที่ระหว่างเส้นใบมีสีเหลือง (สุมิตรา, 2544)

การขาดธาตุสังกะสีในลิ้นจี่พบว่า ใบของลิ้นจี่พับหงิกงอ มีผลขนาดเล็กและความหวานของลิ้นจี่ลดลง ยังส่งผลให้การติดผลลดลงและยับยั้งการเจริญเติบโตของผล (Roygrong *et al.,* 2016) การขาดธาตุสังกะสีในมะม่วงพบว่า ใบมีขนาดเล็กกว่าปกติและผิดรูปลักษณะใบเป็นกระจุกที่ปลายยอด (Oppenheimer *et al.,* 1961) ดังนั้นธาตุอาหารพืชจึงมีความสำคัญต่อพืชเช่นเดียวกับที่อาหารมีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตทั่วไป ถ้าพืชได้รับธาตุอาหารที่จำเป็นครบทุกธาตุและในสัดส่วนที่เหมาะสมพืชจะมีการเจริญเติบโตได้ดีแต่ในทางตรงกันข้ามถ้าพืชได้รับธาตุอาหารไม่เพียงพอหรืออยู่ในสัดส่วนที่ไม่เหมาะสมจะแสดงอาการผิดปกติหรือการเจริญเติบโตลดลงและอาจถึงตายในที่สุด

**ความเป็นพิษจากสังกะสี**

พืชที่ไม่ทนต่อสังกะสีหากได้รับธาตุนี้มากจะเป็นพิษ ระดับความเป็นพิษของสังกะสีในใบพืชทั่วไปพืชทั่วไปมีค่าตั้งแต่ 100 จนถึงสูงกว่า 400-500 มก./กก. ใบแห้ง และอาการแรกที่เด่นชัดคือรากหยุดหารยืดตัว นอกจากนั้นใบอ่อนจะเหลืองซีดซึ่งอาการขาดเหล็กในภาวะที่มีสังกะสีมากเกินไปทั้งนี้เพราะทั้งสองธาตุมีขนาดของไฮเดรตไอออนใกล้เคียงกันจึงเป็นปฏิปักษ์ต่อกันในการดูดที่รากและรากพืชดูดเหล็กมาได้น้อยลง วิธีลดความเป็นพิษอันเกิดจากสังกะสีทำได้คือใส่ปูนเพื่อยกระดับความเป็นกรดด่างของดิน และปลูกพืชที่ทนต่อพิษของสังกะสี (Boardman *et al.,* 1990)

**ลักษณะของผลลำไยที่มีความผิดปกติ(เปลือกสีแดง)**

ปัญหาที่พบของผลลำไยคือลำไยมีลักษณะเปลือกสีแดงซึ่งปกติแล้วเปลือกของผลลำไยจะมีลักษณะสีเปลือกของผลลำไยมีสีน้ำตาลปนเหลืองลักษณะนี้เป็นที่ต้องการของตลาดและผู้บริโภค การที่เกษตรกรพบเจอปัญหานี้ทำให้ผลผลิตเกิดความเสียหาย คุณภาพผลผลิตลดลงและไม่เป็นที่ต้องการของตลาดจนทำให้เป็นปัญหาอย่างมาก

**ความผิดปกติทางสรีรวิทยาของผลลำไย**

ความผิดปกติทางสรีรวิยาของผลลำไย (physiological disorder syndromes) หรือที่เกษตรกรบางพื้นที่เรียกว่า “โรคลำไยผลแดง” หรือมีชื่อเรียกอื่นๆ เป็นอาการที่ผลลำไยมีลักษณะผลสีค่อนข้างแดงในระหว่างการเจริญเติบโตของผล ทำให้ผลของลำไยผลนั้นหรือช่อผลนั้นมีลักษณะผลที่

เล็กไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นผลขนาดใหญ่ได้ ทำให้เกิดความเสียหายเกิดขึ้นกับผลผลิตของเกษตรกร โดยเฉพาะหากมีการระบาดในหลายพื้นที่ที่มีการเพาะปลูกลำไย อย่างไรก็ตามแม้จะเรียกว่าเป็นความผิดปกติทางสรีรวิทยาของผลลำไยแต่การระบาดในแต่ละพื้นที่จะมีการแสดงออกของกลุ่มอาการที่มีลักษณะที่แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ โดยมีลักษณะในการแสดงลักษณะของความผิดปกตินี้เช่น ลักษณะสีผิวของเปลือกที่มีลักษณะสีเข้มขึ้นหรือจางลงแล้วแต่ละพื้นที่เพาะปลูก นอกจากนี้ลักษณะเนื้อของผลลำไยที่เป็นกลุ่มอาการนี้มักมีลักษณะแห้งและมีสีเปลือกที่แตกต่างไปจากลักษณะลำไยปกติ สำหรับสาเหตุของอาการผิดปกติยังไม่สามารถระบุสาเหตุที่แน่นอน แต่มีรายงานว่าเกิดจากผลกระทบทางสรีรวิทยาของต้นลำไยที่ถูกชักนำโดยหลายปัจจัยเช่น การใช้ธาตุอาหารหลักเป็นจำนวนมากติดต่อกันเป็นเวลานาน การใช้สารเคมีในการเร่งกระบวนการต่างๆในต้นลำไย ความผิดปกติของบางสายพันธุ์ลำไยที่อาจเกิดกลุ่มอาการนี้ได้ง่าย และสภาพแวดล้อมของแหล่งเพาะปลูก อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถตรวจพบว่ากลุ่มอาการเหล่านี้เกิดจากเชื้อโรคใด อาจจะไม่ใช่โรคลำไย แต่เป็นกลุ่มอาการหนึ่งของผลผลิตของผลลำไยที่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้เต็มที่ และเนื่องจากไม่ใช่โรคที่มีสาเหตุโดยตรงหรือชัดเจน การยับยั้งป้องกันหรือการควบคุมอาการแสดงออกของโรค จึงอาจทำได้ยากเพราะต้องอาศัยการควบคุมหลายๆปัจจัย (เอกวิทย์ และคณะ, 2560)

สำหรับการศึกษากลุ่มอาการนี้ในผลลำไย ส่วนหนึ่งได้จากการศึกษาปัญหาลำไยอาการผลแตกหรือ Fruit cracking เกิดจากความไม่สมดุลของการขยายตัวของส่วนเนื้อและส่วนเปลือกโดยส่วนของเนื้อมีลักษณะเป็นเซลล์อ่อนนุ่ม (spongy parenchyma) ซึ่งมีความสามารถในการยืดหดตัวได้สูงในขณะที่เปลือกมีความยืดหยุ่นตัวต่ำกว่า ดังในกรณีที่ส่วนของเนื้อผลมีการขยายปริมาตรอย่างรวดเร็วนั้นเกิดแรงดันจากการขยายตัวของเนื้อผลทำให้เปลือกผลแตกได้ (พาวิน และคณะ, 2547) อาการทางกายภาพของลำไยที่แตกสาเหตุที่แท้จริงเกิดจากผลลำไยที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตนั้นกระทบกับสภาพแล้ง อุณหภูมิสูง หรือขาดน้ำมาก่อน จากนั้นได้รับน้ำในปริมาณหรือเกิดจากการขาดช่วงฝนจึงได้รับน้ำไม่สม่ำเสมอส่งผลให้ผลแตกและหลุดร่วงได้ ปัจจัยที่เกี่ยวข้องคือสภาพภูมิอากาศแปรปรวนและการจัดการน้ำที่ไม่เหมาะสม อีกปัจจัยหนึ่งคือสภาพแวดล้อมภายในต้นลำไยมักพบว่าต้นลำไยที่ติดผลดก ผลมีขนาดเล็กและเปลือกบางมักจะถูกชักนำให้แสดงอาการผลแตกได้ง่าย สามารถแก้ไขได้โดยการให้น้ำลำไยอย่างสม่ำเสมอและเพียงพอ การดูแลเรื่องธาตุอาหารเสริมโดยเฉพาะแคลเซียมอาจจะช่วยลดความเสียหายที่อาจจะเกิดกับสวนลำไยได้ (ศูนย์วิจัยเศรษฐกิจและพยากรณ์ทางการเกษตร, 2553)

แต่อย่างไรก็ตามผลการศึกษาในแง่ของกระบวนการทางชีวเคมีและโมเลกุล ตลอดจนเมแทบอลิซึมและธาตุอาหารชนิดอื่นนี้ยังไม่ปรากฏผลที่ชัดเจน นอกจากนี้การควบคุมปริมาณผลต่อต้นและต่อช่อที่มากเกินไปทั้งจำนวนผลต่อต้นและต่อช่ออาจเป็นอีกหนึ่งสาเหตุที่ทำให้ลำไยมีผลขนาดเล็กและเกิดความผิดปกติทางสรีรวิทยาของผลได้ เพราะต้นลำไยที่ติดผลดกเกิดการแย่งอาหารที่ใบ

สร้างขึ้นและอาหารที่สะสมในต้นทำให้ไม่เพียงพอต่อผลลำไย โดยสรุปสาเหตุกลุ่มอาการความผิดปกติทางสรีรวิทยาของผลลำไยอาจมีสาเหตุได้หลายปัจจัยและยังหาบทสรุปที่ชัดเจนยังไม่ได้ ดังนั้นการวินิจฉัยกลุ่มอาการความผิดปกติทางสรีรวิทยาของผลลำไยก่อนที่จะแสดงลักษณะออกมาจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างมาก ในการยับยั้งป้องกันและควบคุมการระบาดของกลุ่มอาการความผิดปกติทางสรีรวิทยาของผลลำไยได้ (เอกวิทย์ และคณะ, 2560)

นอกจากนี้ยังพบว่าองค์ประกอบหลักในลำไยจะประกอบด้วย โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต สำหรับโปรตีนที่พบในผลลำไยแม้ว่าจะเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีสัดส่วนไม่มากเมื่อเทียบกับสารชีวโมเลกุลชนิดอื่น แต่เนื่องจากโปรตีนมีหน้าที่สำคัญต่อสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะกระบวนการต่างๆที่นำมาสู่การพัฒนาของผลลำไย (อรัญญา, 2555)

# บทที่ 3
# วิธีการวิจัย

## สถานที่ทำการทดลอง

การศึกษาความผิดปกติทางสรีรวิทยาของผลลำไยทำการศึกษาที่สวนลำไย สาขาไม้ผล บ้านโปง อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ และห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่

**พันธุ์ลำไย**

## วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. เก็บตัวอย่างต้นลำไยที่ปกติและต้นลำไยที่มีลักษณะผิดปกติ(เปลือกสีแดง) โดยแบ่งระยะการเก็บหลังติดผลแล้วทุกๆ 5, 10, 15, 20, 25, 30 สัปดาห์ และทำการเก็บตัวอย่างผลลำไยกับตัวอย่างใบลำไยตำแหน่งที่ 3, 4 จากยอด (ยุทธนา และคณะ, 2545)

2 เครื่องมือและอุปกรณ์แสดงตารางผนวกที่ 1

3. สารเคมีในการทดลองศึกษาทางสรีรวิทยาของผลลำไย และการแสดงออกของโปรตีนในผลลำไยโดยใช้เทคนิค 2-DE electrophoresis ได้มีการใช้สารเคมีแสดงตารางผนวกที่ 2

**วิธีการทดลอง**

**การวิจัยแบ่งออกเป็น 3 การทดลองดังนี้**

**การทดลองที่ 1.ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผล**

โดยมีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) ของทุกสวนที่ทำการทดลอง โดยเริ่มเก็บตัวอย่างสัปดาห์ที่ 5 หลังการติดผลทั้งต้นปกติ

และต้นผิดปกติ(เปลือกสีแดง) จากนั้นเว้นระยะเก็บตัวอย่างเป็น 7 ระยะ คือระยะติดผลที่ 5 สัปดาห์, 10 สัปดาห์, 15 สัปดาห์, 20 สัปดาห์, 25 สัปดาห์, 30 สัปดาห์ และ 35 สัปดาห์หรือระยะเก็บเกี่ยว แต่ละระยะเก็บข้อมูลอย่างละ 3 ซ้ำๆละ 1 ต้น ต้นละ 20 ผล

**วิธีดำเนินการ**

1) เก็บผลลำไยทั้งต้นปกติ 3 ต้น และต้นผิดปกติ(เปลือกสีแดง) 3 ต้น จำนวนต้นละ 20 ผล ดังนั้นจะได้ผลจากต้นปกติ 60 ผล จากนั้นทำการสุ่มออกมาจำนวน 20 ผล ทั้งต้นปกติและต้นผิดปกติ(เปลือกสีแดง)

2) ลักษณะผล ทำการเก็บข้อมูล ดังนี้

วัดขนาดผลความกว้างและความยาวทำการวัดโดยใช้ Vernier Caliper, วัดค่าสีโดยใช้เครื่องวัดสี Color Meter (Portable) : ยี่ห้อ Minolta รุ่น CR-10 ผลิตที่ประเทศจีน

- ชั่งน้ำหนัก
- ทำการเก็บข้อมูลแล้ว นำผลลำไยแช่ตู้ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการทดลองที่ 3 ต่อ
- ส่วนผลที่เหลือ วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH), ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (total soluble solid) และวิตามินซี

3) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA)

**การทดลองที่ 2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของธาตุอาหารสังกะสีและโบรอนในใบลำไยที่ผลปกติและผลผิดปกติ(เปลือกสีแดง)**

เก็บตัวอย่างใบจากต้นทดลองที่ 1 ตามระยะเวลา 5 สัปดาห์, 15 สัปดาห์, 25 สัปดาห์ และ 35 สัปดาห์หรือหลังการติดผล โดยการเก็บตัวอย่างใบลำไยตำแหน่งที่ 3, 4 จากยอด ทั้งต้นปกติและผิดปกติ(เปลือกสีแดง)

**วิธีดำเนินการ**

1) ลักษณะผล ทำการเก็บข้อมูล ดังนี้

- วัดขนาดใบ (กว้าง x ยาว), วัดค่าสี
- เก็บใบลำไยอบที่อุณหภูมิ 70 องศา เป็นเวลา 2 วัน เพื่อรอวิเคราะห์ธาตุอาหารในใบลำไย

2) วิเคราะห์ธาตุอาหารใบโดยวิเคราะห์สังกะสีและโบรอน

**การทดลองที่ 3. ศึกษาระดับโปรตีนเพื่อบ่งชี้อาการผิดปกติของผลลำไยปกติและผิดปกติ (เปลือกสีแดง)**

1. นำผลลำไยที่เก็บต้นเดียวกับการทดลองที่ 1 นำมาแยกส่วนเนื้อ เปลือกและเมล็ด

2. ทำการล้างให้สะอาด แล้วตัดให้เป็นชิ้นเพื่อนำไปบดจนละเอียดในโกร่งโดยใช้ไนโตรเจนเหลว

3. นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ในในการสกัดด้วย extraction solution แสดงดังภาคผนวก ข.

# บทที่ 4
# ผลการทดลองและวิจารณ์

**ผลการทดลองที่ 1. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผล**

สำหรับการศึกษาลำไยปกติและลำไยที่มีความผิดปกติทางสรีรวิทยาของผล ช่วงระยะการเจริญเติบโตของผลลำไยได้ศึกษาวิจัยที่สวนลำไย สาขาไม้ผล บ้านโปง สำนักฟาร์มมหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ พบว่าการเจริญเติบโตของผลลำไยในสัปดาห์ที่ 5-15 หลังการติดผลไม่พบอาการผิดปกติทางสรีรวิทยาของผล เริ่มพบอาการผิดปกติของผลที่สัปดาห์ที่ 20-30 หลังการติดผลโดยความผิดปกติที่พบคือผิวเปลือกเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีแดงต่อมามีการร่วงหล่นของผลลำไย (ภาพที่ 5)

**ภาพที่ 5** ลักษณะผลลำไยปกติ (A ถึง F) และลำไยผิดปกติทางสรีรวิทยา (G ถึง I) ที่ระยะเวลา 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 สัปดาห์หลังการติดผล

**ความกว้าง ความยาว และน้ำหนักของใบลำไยปกติและใบลำไยผิดปกติ(เปลือกสีแดง)**

พบว่าใบลำไยปกติและใบลำไยผิดปกติ(เปลือกสีแดง) มีการเจริญเติบโตด้านความกว้าง ความยาว และน้ำหนักใบตามกระบวนการพัฒนาของใบแต่ละสัปดาห์ โดยสัปดาห์ที่ 5 ถึงสัปดาห์ที่ 30 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งคือสัปดาห์ที่ 5 มีค่าความกว้าง ความยาว และน้ำหนักของใบเท่ากับ 4.21, 12.15 เซนติเมตรและ 0.05 กรัมตามลำดับ เช่นเดียวกับในใบลำไยผิดปกติ(เปลือกสีแดง) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งในสัปดาห์ที่ 5 มีค่าความกว้าง ความยาว และน้ำหนักของใบเท่ากับ 4.23, 12.33 เซนติเมตรและ 0.07 กรัมตามลำดับ (ตารางที่ 2) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะต้นลำไยที่ให้ผลผลิตและมีอายุมากจะผลิใบประมาณ 1-2 ครั้งหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิตประมาณ 3-4 สัปดาห์ และมีการผลิใบอีกครั้ง (ตระกูล, 2533) สำหรับลำไยที่มีอายุมากกว่า 30 ปีพบว่ามีการผลิใบครั้งเดียวก็สามารถออกดอกได้ ส่วนใหญ่ต้นที่มีอายุน้อยจะผลิใบประมาณ 2 ครั้งก่อนออกดอก (พาวิน และคณะ, 2547)

**ตารางที่ 2** ลักษณะทางกายภาพของความกว้าง ความยาว และน้ำหนักของใบลำไยปกติและใบลำไยผิดปกติ (เปลือกสีแดง)

| สัปดาห์ที่ | ความกว้าง ความยาว และน้ำหนักใบของลำไยปกติและผิดปกติสัปดาห์ที่ 5-30 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ใบลำไยปกติ | | | ใบลำไยผิดปกติ (เปลือกสีแดง) | | |
| | ความกว้าง (ซม.) | ความยาว (ซม.) | น้ำหนัก (กรัม) | ความกว้าง (ซม.) | ความยาว (ซม.) | น้ำหนัก (กรัม) |
| 5 | 4.21e | 12.15d | 0.05d | 4.23e | 12.33de | 0.07e |
| 10 | 3.97e | 11.29d | 0.25d | 4.09e | 11.40e | 0.33de |
| 15 | 4.86d | 11.58d | 0.78d | 4.73d | 13.16d | 1.01d |
| 20 | 4.58c | 16.10c | 1.99c | 4.46c | 15.59c | 2.24c |
| 25 | 4.66b | 18.69b | 4.40b | 5.63b | 18.84b | 4.80b |
| 30 | 6.36a | 21.86a | 6.56a | 5.20a | 21.14a | 5.77a |
| F-test | ** | ** | ** | ** | ** | ** |
| CV(%) | 11.04 | 9.41 | 35.13 | 8.98 | 7.90 | 23.63 |

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99% เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test (DMRT)

**ลักษณะทางกายภาพสีใบภายนอกของลำไยปกติและลำไยผิดปกติ(เปลือกสีแดง)**

ลักษณะสีของใบพบว่าสีใบลำไยปกติและสีใบลำไยผิดปกติ(เปลือกสีแดง) ในสัปดาห์ที่ 20 ถึงสัปดาห์ที่ 30 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยลำไยผิดปกติที่เริ่มพบว่ามีความความผิดปกติในสัปดาห์ที่ 20 มีค่าความสว่าง (L*) ค่าสีแดง (a*) และค่าสีเหลือง (b*)เท่ากับ 32.64, -3.70 และ 14.74 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ความผิดปกติของสีใบอาจเป็นเพราะค่าสีของใบเป็นดัชนีที่บ่งบอกถึงคุณภาพของต้นลำไยมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณคลอโรฟิลล์ (Ma *et al.,* 2009) ในลำไยผิดปกติ(เปลือกสีแดง) มีค่าสี L*, a*, และb* สูงกว่าลำไยปกติ แต่ทั้งสองลักษณะยังอยู่ในช่วงของสีเขียวความเปลี่ยนแปลงของสีใบขึ้นอยู่กับปัจจัยทั้งภายในและภายนอก ซึ่งได้แก่อุณหภูมิ การเกิดบาดแผล การขาดน้ำ และการขาดแสงมีผลกระทบต่อความเครียดส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์ต่างๆ เสื่อมสภาพและปัจจัยอื่นๆขึ้นอยู่กับอายุใบ กระบวนการชราภาพ และสารอาหารเช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และแร่ธาตุต่างๆจะเคลื่อนไปยังใบอ่อน (Buchanan, (1997)

**ตารางที่ 3** ลักษณะทางกายภาพของสีใบลำไยปกติและใบลำไยผิดปกติ (เปลือกสีแดง)

| **สัปดาห์ที่** | **ลักษณะทางกายภาพ: สีใบภายนอก** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **ใบลำไยปกติ** | | | **ใบลำไยผิดปกติ (เปลือกสีแดง)** | | |
| | **(L*)** | **(a*)** | **(b*)** | **(L*)** | **(a*)** | **(b*)** |
| **5** | 32.90ab | -6.03c | 18.19a | N/A | N/A | N/A |
| **10** | 33.45a | -4.54b | 20.39a | N/A | N/A | N/A |
| **15** | 29.80c | -5.20bc | 14.76c | N/A | N/A | N/A |
| **20** | 30.77c | -3.18a | 13.17b | 32.64a | -3.70a | 14.74a |
| **25** | 31.11bc | -5.61bc | 13.70b | 29.80b | -5.20b | 15.76a |
| **30** | 30.28c | -4.67b | 12.35b | 31.39ab | -4.51ab | 14.01a |
| **F-test** | ** | ** | ** | ** | ** | ** |
| **CV(%)** | 5.31 | -22.02 | 14.49 | 5.39 | -19.46 | 16.99 |

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99% เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

N/A ไม่มีการประเมินเพราะยังไม่เกิดความผิดปกติทางสรีรวิทยาของผล

**ค่าความกว้าง ความยาว และน้ำหนักของผลลำไยปกติและใบลำไยผิดปกติ(เปลือกสีแดง)**

ลักษณะทางกายภาพของผลพบว่าผลลำไยปกติและผลลำไยผิดปกติ(เปลือกสีแดง) มีการเจริญเติบโตของผลตามกระบวนการพัฒนาของผลในแต่ละสัปดาห์ โดยสัปดาห์ที่ 5 ถึงสัปดาห์ที่ 30 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งคือสัปดาห์ที่ 30 ของผลลำไยผิดปกติ(เปลือกสีแดง) มีค่าความกว้าง ความยาว และน้ำหนักเท่ากับ 24.03, 21.95 มิลลิเมตรและ 7.68 กรัม ซึ่งมากกว่าผลลำไยปกติในสัปดาห์ที่ 30 ซึ่งผลที่ผิดปกติ(เปลือกสีแดง) มีแนวโน้มสูงกว่าผลลำไยปกติตั้งแต่สัปดาห์ที่ 25 (ตารางที่ 4) เพราะค่าลักษณะทางกายภาพของผลลำไยปกติต่ำกว่าผลลำไยผิดปกติ(เปลือกสีแดง) ในระยะสัปดาห์ที่ 25 เป็นต้นไป ซึ่งโดยปกติในสัปดาห์นี้เป็นระยะการเจริญเติบโตผลช้าลง เพราะส่วนของเนื้อลำไยและเมล็ดมีการเจริญเติบโตเกือบจะคงที่ (พาวิน และคณะ, 2547) ปัจจัยหนึ่งที่ทำให้น้ำหนักของผลลดลงคือ การแย่งอาหารหรือนำไปซ่อมแซมบาดแผลทำให้ผลลำไยมีน้ำหนักและขนาดผลน้อยลง การนำสารที่ช่วยเพิ่มความหนาของเนื้อและน้ำหนักของผลลิ้นจี่และลำไยเพิ่มขึ้นได้ (Peng *et al.,* 2004)

**ตารางที่4** ลักษณะทางกายภาพน้ำหนัก และขนาดผลของลำไยปกติเทียบกับลำไยผิดปกติ(เปลือกสีแดง) ในระยะการเจริญเติบโตต่างๆ (ตั้งแต่ 5 ถึง 30 สัปดาห์)

| สัปดาห์ | ลักษณะทางกายภาพ ขนาดของผลลำไย | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ลำไยผลปกติ | | | ลำไยผิดปกติ(เปลือกสีแดง) | | |
| | ความกว้าง (มม.) | ความยาว (มม.) | น้ำหนัก (กรัม) | ความกว้าง (มม.) | ความยาว (มม.) | น้ำหนัก (กรัม) |
| 5 | 3.53f | 4.79e | 0.02d | 4.49f | 5.67f | 0.06e |
| 10 | 6.41e | 8.38d | 0.24cd | 7.56e | 10.35e | 0.32bc |
| 15 | 10.57d | 11.46c | 0.76c | 10.83d | 13.11d | 0.84d |
| 20 | 14.97c | 15.57b | 2.23b | 14.06c | 15.24c | 2.15c |
| 25 | 16.44b | 16.44b | 2.63b | 18.50b | 17.82b | 4.11b |
| 30 | 21.12a | 20.07a | 5.36a | 24.03a | 21.95a | 7.68a |
| F-test | ** | ** | ** | ** | ** | ** |
| CV(%) | 8.30 | 8.57 | 30.50 | 8.68 | 8.44 | 21.73 |

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ตามการเปรียบเทียบ Duncan’s New Multiple Range Test (DMRT)

**ลักษณะทางกายภาพสีผลภายนอกของลำไยปกติและลำไยผิดปกติ(เปลือกสีแดง)**

ลักษณะสีของผลภายนอกพบว่าสีผลลำไยปกติและสีผลลำไยผิดปกติ(เปลือกสีแดง) ในสัปดาห์ที่ 20 ถึงสัปดาห์ที่ 30 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยลำไยผิดปกติที่เริ่มพบว่ามีความความผิดปกติที่สัปดาห์ที่ 20 ซึ่งในสัปดาห์ที่ค่าสี L* a* และb* ในผลลำไยปกติมีค่ามากกว่าผลลำไยผิดปกติ(เปลือกสีแดง) มีค่าเท่ากับ 48.43, 7.80, และ 32.15 ตามลำดับ (ตารางที่ 5) เพราะว่าโดยปกติและผลของลำไยจะมีสีเหลืองอมเขียวจึงเป็นที่ต้องการของตลาด การทำให้ผิวลำไยสวยและคุณภาพดีควรตัดแต่งกิ่งในลำไยอยู่ในทรงพุ่ม การป้องกันแมลงจำพวกปากดูดซึ่งส่งผลต่อถึงคุณภาพผล (พาวิน และคณะ, 2547) และการแก้ไขพืชขาดธาตุที่ส่งผลให้เกิดความผิดปกติทางสรีรวิทยานี้ในช่วงเวลาที่เหมาะสม (Li *et al.,* 2001) จะเห็นได้ว่าคุณภาพผลผลิตขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยถ้ามีการจัดการที่ดี หาสาเหตุของความผิดปกตินี้ได้เร็วและแก้ไขทันเวลาก็จะส่งผลให้มีผลผลิตที่มีคุณภาพ (พาวิน และคณะ, 2547)

**ตารางที่ 5** ลักษณะทางกายภาพสีผลของผลลำไยปกติและผลลำไยผิดปกติ(เปลือกสีแดง) ในระยะการเจริญเติบโตตั้งแต่ 5 ถึง 30 สัปดาห์

| สัปดาห์ที่ | ลักษณะทางกายภาพ สีผลภายนอก | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ผลลำไยปกติ | | | ผลลำไยผิดปกติ (เปลือกสีแดง) | | |
| | (L*) | (a*) | (b*) | (L*) | (a*) | (b*) |
| 5 | 43.46b | 1.45c | 24.68b | N/A | N/A | N/A |
| 10 | 42.06b | 8.64a | 32.32ab | N/A | N/A | N/A |
| 15 | 43.09b | 4.70bc | 26.94ab | N/A | N/A | N/A |
| 20 | 48.43a | 7.80ab | 32.15ab | 44.93a | 7.74a | 31.30a |
| 25 | 41.38b | 6.79ab | 32.94ab | 39.97b | 7.59a | 30.43a |
| 30 | 42.06b | 5.14b | 34.90a | 43.72a | 8.46a | 29.40a |
| F-test | ** | ** | ** | ** | ** | ** |
| CV(%) | 4.78 | 49.92 | 24.07 | 2.38 | 24.93 | 5.95 |

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ตามการเปรียบเทียบ Duncan’s New Multiple Range Test (DMRT)

N/A ไม่มีการประเมินเพราะยังไม่เกิดความผิดปกติทางสรีรวิทยาของผล

ผลลำไยปกติ (A)

ผลลำไยผิดปกติ(เปลือกสีแดง) (B)

**ภาพที่ 6** ลักษณะผลลำไยปกติ (A) และผลลำไยผิดปกติ(เปลือกแดง) (B)

**ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ ความเป็นกรด-ด่าง และวิตามินซี**

ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้พบว่า ลำไยปกติและลำไยผิดปกติ(เปลือกสีแดง) ในสัปดาห์ที่ 25 ถึงสัปดาห์ที่ 30 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเท่ากับ 15.22 และ 7.52 องศาบริกซ์ ตามลำดับ แต่มีความแตกต่างทางสถิติกับสัปดาห์ที่ 20 หลังการติดผลทั้งลำไยปกติและลำไยผิดปกติเท่ากับ 5.45 และ 6.54 องศาบริกซ์ ตามลำดับ ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่างของลำไยปกติและลำไยผิดปกติ(เปลือกสีแดง) ในสัปดาห์ที่ 25 ถึงสัปดาห์ที่ 30 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเท่ากับ 7.48 และ 7.19 9 ตามลำดับ แต่มีความแตกต่างทางสถิติกับสัปดาห์ที่ 20 หลังการติดผลทั้งลำไยปกติและลำไยผิดปกติเท่ากับ 7.33 และ 6.99 ตามลำดับ และปริมาณวิตามินซีของลำไยปกติและลำไยผิดปกติ(เปลือกสีแดง) ในสัปดาห์ที่ 20 ถึงสัปดาห์ที่ 30 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเท่ากับ 0.01 และ 0.01 มิลลิกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 6) เพราะว่าปริมาณของแข็งละลายน้ำได้พบว่าลำไยปกติมีค่ามากว่าลำไยผิดปกติ(เปลือกสีแดง) อาจจะมาจากการใช้โพแทสเซียมคลอเรตจะเกิดการสลายตัวของสารคลอไรท์และไฮโปคลอไรท์ ซึ่งจะแสดงความเป็นพิษต่อทุกเซลล์ ทำให้การใช้ไนโตรเจนลดลงปกติ ไนโตรเจนจำเป็นต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโน กรดนิวคลีอิค อาร์เอ็นเอ และดีเอ็นเอ (Hewitt *et al.,* 1956) เมื่อไนโตรเจนลดลงส่งผลให้น้ำตาลและคาร์โบไฮเดรตลดลงด้วยซึ่งจะถูกส่งไปยังส่วนต่างๆของพืชรวมทั้งผล ทำให้อาหารที่สะสมในผลลำไยมีปริมาณลดลงและปริมาณของแข็งละลายน้ำได้ในผลลำไยลดลงตามไปด้วย (ยงยุทธ, 2543) สำหรับการหาค่าวิตามินซีจะช่วยในการบ่งบอกถึงคุณภาพของลำไย (ศิริโสภา, 2555) การสูญเสียปริมาณวิตามินซีของผลผลิตเกิดจากการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดเช่น ascorbic acid oxidase, polyphenol oxidase และ peroxidase (Bourton, 1982)

**ตารางที่ 6** สมบัติทางเคมีของลำไยปกติและลำไยผิดปกติ(เปลือกสีแดง) ที่ระยะการเจริญเติบโต 20-30 สัปดาห์หลังติดผล

| สัปดาห์ | ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (°Birx) | | ปริมาณวิตามินซี (mg)/100g. | |
|---|---|---|---|---|
| | ลำไยปกติ | ลำไยผิดปกติ (เปลือกสีแดง) | ลำไยปกติ | ลำไยผิดปกติ (เปลือกสีแดง) |
| **20** | 5.45b | 6.54b | 0.01 | 0.01 |
| **25** | 15.22a | 7.52a | 0.01 | 0.01 |
| **30** | 15.22a | 7.52a | 0.01 | 0.01 |
| **F-test** | ** | ** | ns | ns |
| **CV(%)** | 1.48 | 1.40 | 34.23 | 33.54 |

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99%
เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

**ผลการทดลองที่ 2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของธาตุสังกะสีและโบรอนในใบลำไยที่มีลักษณะปกติและผิดปกติ(เปลือกสีแดง)**

การเปลี่ยนแปลงธาตุอาหารสังกะสีและโบรอนในใบลำไยพบว่าสัปดาห์ที่ 5 หลังการติดผลธาตุอาหารสังกะสีอยู่ระหว่างปริมาตรธาตุอาหารที่เหมาะสม แต่ธาตุอาหารโบรอนต่ำกว่าค่าธาตุอาหารที่เหมาะสมมีค่าเท่ากับ 16 และ 4.6 ppm ตามลำดับ แต่ในสัปดาห์ที่ 15 ถึงสัปดาห์ที่ 35 หลังการติดผลพบว่าธาตุอาหารสังกะสีและโบรอนมีค่าต่ำกว่าปริมาณธาตุอาหารที่เหมาะสมมีค่าเท่ากับ 14, 3.9 ppm ตามลำดับ (ตารางที่ 7) เพราะว่าจากผลการศึกษาค่าปริมาณธาตุอาหารของแต่ละสัปดาห์ค่อนข้างต่ำกว่าปริมาณธาตุอาหารที่เหมาะสมดังตารางที่ 8 (ยุทธนา และคณะ, 2545) ส่งผลทำให้คุณภาพของผลผลิตลำไยลดลงแต่ถ้ามีการฉีดพ่นธาตุสังกะสีและโบรอนจะทำให้คุณภาพของผลลำไยดีขึ้น (WiriyaAlongkorn *et al.,* 2007) การเก็บใบในตำแหน่งที่ 3 และ 4 จากยอดนำมาวิเคราะห์พบว่าปริมาณของธาตุอาหารสังกะสีในต้นลำไยโทรมมีปริมาณสังกะสีค่อนข้างต่ำกว่าเมื่อเทียบกับสวนที่สมบูรณ์และขนาดของใบมีขนาดเล็กลงเมื่อได้รับธาตุสังกะสีไม่เพียงพอ (ยุทธนา และคระ, 2545) จากการศึกษาของ (Menzel *et al.,* 1988) พบว่าลิ้นจี่ที่มีการติดผลมากทำให้ธาตุอาหารสังกะสีลดลงไปด้วย และระยะที่ลำไยสร้างเนื้อความต้องการธาตุอาหารสังกะสีค่อนข้างมากและความต้องการของสักกะสีลดลงเมื่อผลผลิตเริ่มแก่ แต่การลดลงของปริมาณธาตุสังกะสีในใบอาจจะเกี่ยวข้องกับอายุของใบที่มากขึ้น (Menzel *et al.,* 1987) ปริมาณโบรอนที่ต่ำส่งผลให้ปริมาณ

ผลผลิตลดลงและขนาดผลเล็กในพลับที่มีการพ่นสารแล้วทำให้ผลผลิตมีปริมาณเพิ่มขึ้นและมีขนาดใหญ่อย่างชัดเจน (Thongjoo *et al.,* 2016) การฉีดพ่นโบรอนทางใบในระยะการพัฒนาของใบลำไยพบว่าโบรอนสามารถลดอัตราการสูญเสียน้ำหนักของผลลำไยจึงทำให้ผลลำไยมีน้ำหนักผลดีมีคุณภาพ (Wei *et al.,* 2007) และพืชในระยะเจริญพันธุ์จะมีอัตราการสังเคราะห์โปรตีนสูงนอกจากนี้ยังพบว่าธาตุสังกะสีมีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอและการลดลงของธาตุสังกะสีอาจเป็นผลมาจากพืชมีการใช้ธาตุสังกะสีในการสังเคราะห์โปรตีนระหว่างการออกดอกติดผล (Taiz *et al.,* 2006) แม้พืชจะต้องการธาตุอาหารรองในปริมาณน้อย แต่ธาตุอาหารรองก็มีความสำคัญต่อพืชจะขาดธาตุใดธาตุหนึ่งไม่ได้ (ยุทธนา และคณะ, 2548) เพราะพืชต้องการธาตุอาหารทุกชนิดในปริมาณที่เพียงพอจึงจะเจริญเติบโตได้ดี (สันติ และคณะ, 2548)

**ตารางที่ 7** ผลวิเคราะห์ตัวอย่างใบลำไยผิดปกติ(เปลือกสีแดง)

| ใบลำไย/สัปดาห์ | สังกะสี (Zn) ppm | โบรอน (B) ppm |
|---|---|---|
| 5 สัปดาห์ | 16 | 4.6 |
| 15 สัปดาห์ | 14 | 3.9 |
| 25 สัปดาห์ | 8 | 3.8 |
| 35 สัปดาห์ | 11 | 7.5 |

**ตารางที่ 8** ปริมาณธาตุอาหารที่เหมาะสมของสังกะสีและโบรอนในใบลำไย (ค่ามาตรฐาน) (ยุทธนา และคณะ, 2554)

| ธาตุอาหาร | ค่าที่เหมาะสม (ppm) |
|---|---|
| สังกะสี (Zn) | 16.99 - 24.29 |
| โบรอน (B) | 22.30 - 45.58 |

**ผลการทดลองที่ 3. ศึกษาระดับโปรตีนเพื่อบ่งชี้อาการผิดปกติของผลลำไยเปลือกสีแดง**

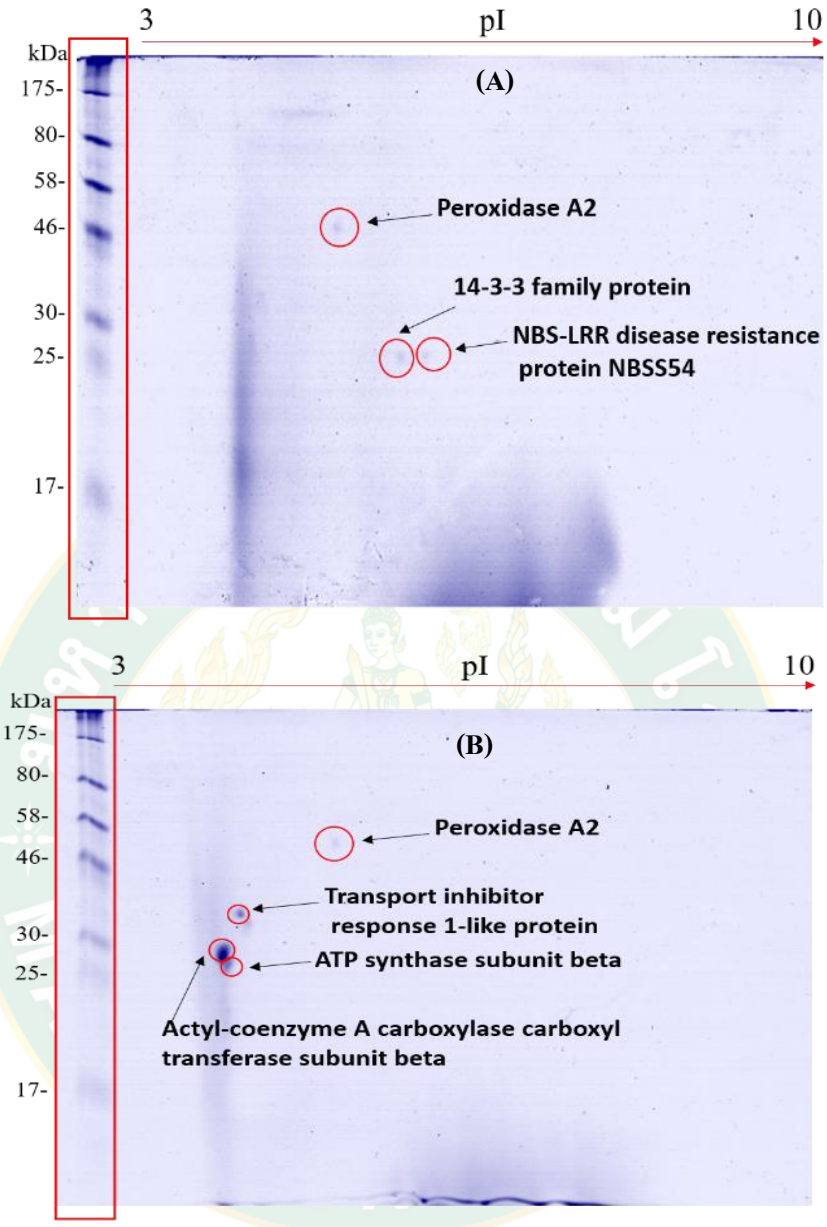
ผลการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค 2D-gel ตามด้วยเทคนิค mass spectrometry ที่สามารถบ่งชี้ระยะการเจริญเติบโตของลำไยหลังการติดผลเป็นระยะเวลา 30 สัปดาห์ นำตัวอย่างเมล็ดในระยะการเจริญเติบโตของผลลำไย 20 และ 30 สัปดาห์หลังการติดผล มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ 2D-gel เนื่องจากระยะนี้สามารถแยกส่วนเปลือก เนื้อและเมล็ดออกจากกันได้ ผลการวิจัย 2D-gel ดังแสดงในภาพที่ 8-9 และระบุลักษณะของโปรตีนที่แสดงออกดังตารางที่ 9 พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนน้อยกว่าที่ควรจะเป็นเพราะปกติแล้วการทำเทคนิค 2D-gel มักพบโปรตีนมาก อาจเนื่องจากระยะการเก็บรักษาตัวอย่างนานถึง 8 เดือนนับหลังจากการเก็บตัวอย่าง และเก็บตัวอย่างที่ศึกษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C โปรตีนที่อยู่ในเมล็ดบางส่วนอาจเกิดสภาวะการเสื่อมสภาพทำให้พบโปรตีนได้น้อย อีกประเด็นหนึ่งโปรตีนที่แสดงออกในเจลนี้อาจจะเป็นโปรตีนที่ทนต่อการเสื่อมสภาพของตัวอย่างก็เป็นไปได้ (ขนิษฐา, 2558) อย่างไรก็ตาม 2D-gel ในระยะ 20 และ 30 สัปดาห์หลังการติดผล พบโปรตีน peroxidase A2 (32.3 KDa) ทั้งระยะ 20 และ 30 สัปดาห์หลังการติดผล ทั้งลำไยที่มีความผิดปกติทางสรีรวิทยาและลำไยปกติโดยไม่มีความแตกต่างในการแสดงออก หมายความว่าโปรตีนนี้น่าจะเป็นโปรตีนทั่วไปของตัวอย่าง

ส่วนโปรตีนชนิดอื่นที่น่าจะเป็นตัวบ่งชี้ความผิดปกติทางสรีรวิทยาของผลใน 2 ลักษณะ หนึ่งเป็นตัวบ่งชี้อาการผิดปกติตลอดระยะเวลาการเจริญเติบโตของผลโดยโปรตีนชนิดนี้จะปรากฏที่มีความแตกต่างระหว่างลำไยที่เป็นโรคความผิดปกติทางสรีรวิทยาของผลและลำไยปกติทั้งระยะ 20 และ 30 สัปดาห์หลังการติดผล คือ โปรตีนชื่อ 14-3-3 family protein (29.5 KDa) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องหลายกระบวนการ (Muslin *et al.,* 2004) เช่น การเจริญเติบโต (developmental pathway) กระบวนการรับรู้สารอาหาร (nutrient sensing) และกระบวนการอยู่รอดของเซลล์ (cell survival pathways) และ โปรตีนชื่อ NBS-LRR disease resistance protein NBSS54 (93.5 KDa) ซึ่งเป็นโปรตีนต้านการเป็นโรคของพืช (Belkhadir *et al.,* 2004) โดยโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ได้แสดงออกในลำไยที่เป็นโรคความผิดปกติทางสรีรวิทยาของผลแต่ไม่แสดงออกในลำไยปกติในระยะเริ่มเกิดอาการของโรคที่สามารถตรวจสอบได้จากการแสดงลักษณะทางกายภาพของผลใน 20 สัปดาห์หลังการติดผล และเมื่อมีการบำรุงรักษาสวนจนลักษณะทางกายภาพของผลไม่แตกต่างระหว่างลำไยที่มีความผิดปกติทางสรีรวิทยาของผลและลำไยปกติใน 30 สัปดาห์หลังการติดผล โปรตีนทั้งสองชนิดนี้ก็จะปรากฏในลำไยทั้งที่มีความผิดปกติและลำไยปกติ แต่ในลำไยที่มีความผิดปกติจะมีการแสดงออกที่มากกว่า นอกจากนี้ในทางกลับกันโปรตีน acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit beta (59.5 KDa) ซึ่งเป็นเอ็นไซม์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมทาบอลิซึมของไขมัน (lipid metabolism) ในวิถีการสร้าง malonyl-CoA (UniProt, 2018a) และ Transport inhibitor response 1-like protein (72.9 KDa) ซึ่งเป็น

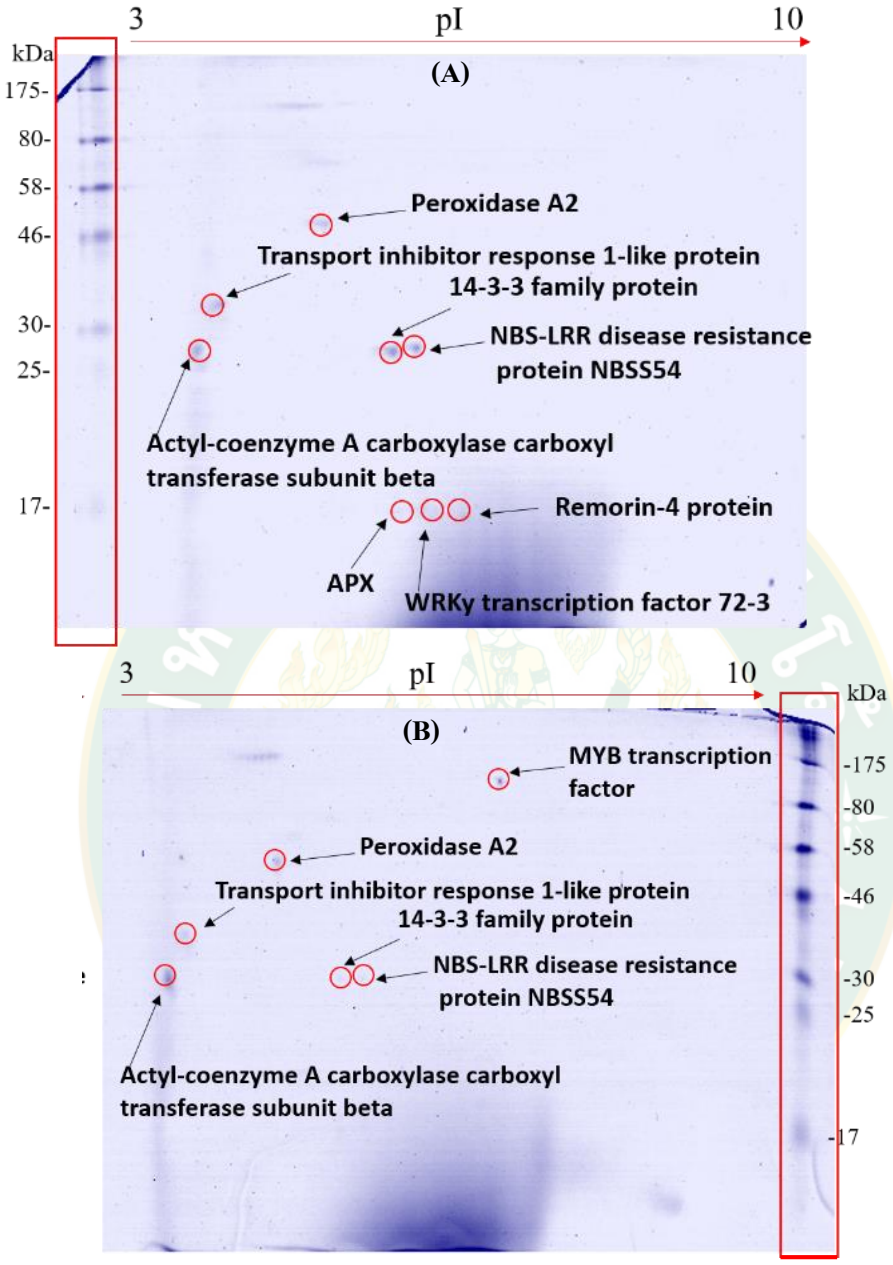
โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการ ubiquition ที่เป็นการเติม ubiquitin ให้กับโปรตีนเป้าหมาย เพื่อให้โปรตีนนั้นถูกกำจัดต่อไป (UniProt, 2018d) โดยโปรตีนทั้งสองชนิดนี้มีการแสดงออกในลำไยปกติแต่ไม่แสดงออกในลำไยที่มีความผิดปกติทางสรีรวิทยาของผลในระยะ 20 สัปดาห์หลังการติดผล และพบการแสดงออกของโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ในลำไยในระยะ 30 สัปดาห์หลังการติดผล ทั้งที่เป็นโรคและลำไยปกติ ดังนั้นสิ่งบ่งชี้โปรตีนทั้งสี่ชนิดดังกล่าวน่าจะเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของความผิดปกติในระยะการเจริญเติบโตของผลได้

การเป็นโรคชนิดเฉพาะเจาะจงต่อระยะเวลาการเจริญเติบโตของผล โดยโปรตีนชนิดนี้จะปรากฏในลักษณะที่แตกต่างระหว่างลำไยที่มีความผิดปกติของผลและลำไยปกติเฉพาะระยะ 20 หรือ 30 สัปดาห์หลังการติดผลเท่านั้น จากผลการศึกษาพบว่าในระยะ 20 สัปดาห์หลังการติดผล พบโปรตีน ATP synthase subunit beta (53.5 KDa) เฉพาะในลำไยปกติเท่านั้นขณะที่ในระยะ 30 สัปดาห์หลังการติดผล พบโปรตีน APX (37.4 KDa) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการกำจัด hydrogen peroxide (UniProt, 2018b) โปรตีนWRKY transcription factor 72-3 (61.0 KDa) ซึ่งเป็นโปรตีนช่วยในขบวนการ DNA transcription (UniProt, 2018e) และ Remorin-4 protein (52.5 KDa) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ยังไม่สามารถระบุหน้าที่ที่แน่ชัด (UniProt, 2018c) โดยโปรตีนทั้ง 3 ชนิดนี้พบได้เฉพาะในลำไยที่มีความผิดปกติเท่านั้น

จากการศึกษาด้านโปรติโอมิกส์ในเมล็ดของลำไยมีการแสดงออกของโปรตีนน้อยและการศึกษาด้วยเทคนิคนี้ยังไม่แพร่หลายเท่าที่ควรในของลำไย รายงานของ Liu *et al.,* 2010. ได้นำเทคนิค 2D-gel มาศึกษาการฝ่อของเมล็ดลำไยพบว่ามีโปรตีนบ่งชี้ 43 ชนิด โปรตีนที่พบส่วนใหญ่เกี่ยวของกับกระบวนการ metabolism, programed cell death, antioxidative processes, chaperonin, cell division, amino acid metabolism, secondary metabolism นอกจากนี้ยังมีรายงานของอัญชนา 2556 พบโปรตีนชื่อ vegetative storage protein ในความผิดปกติทางสรีรวิทยาของลำไยระยะผลอ่อนเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญทางเมแทบอลิซึม เกี่ยวข้องกับการสะสมอาหารของพืชเพื่อเข้าสู่การเปลี่ยนฤดูกาล โปรตีนในพืช *Sapindus mukorossi* ซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกับลำไยโปรตีนที่พบมีความเกี่ยวข้องในการยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสซึ่งพบโปรตีนชนิดนี้มีการลดลงช่วงการพัฒนาราก (Liu *et al.,* 2009) และในการเจริญเติบโตของผลมีความเกี่ยวข้องกับโปรตีนชนิดนี้ (Franceschi *et al.,* 1983) (Staswick, 1989) หมายความว่าหากโปรตีนชนิดนี้โดนรบกวนจะทำให้การสะสมอาหารของพืชที่ใช้ในกระบวนการเจริญเติบโตของผลและเมล็ดลดลงทำให้พืชไม่สามารถเจริญเติบโต (Dhont *et al.,* 2006 )




**ภาพที่ 7** โปรตีนในเมล็ดของผลลำไยที่มีความผิดปกติทางสรีรวิทยา (A) และลำไยปกติ (B) ในระยะ 20 สัปดาห์หลังการติดผล ด้วยการวิเคราะห์ 2D-gelในสภาวะ IPG strip pH 3-10 NL ขนาด 7 ซม., 12.5% เจล เทคนิคการย้อม Coomassie brilliant blue R-250 ปริมาณโปรตีน 300 $\mu$g และชนิดโปรตีนที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS




**ภาพที่ 8** โปรตีนในเมล็ดของผลลำไยที่มีความผิดปกติทางสรีรวิทยา (A) และลำไยปกติ (B) ในระยะ 30 สัปดาห์หลังการติดผล ด้วยการวิเคราะห์ 2D-gelในสภาวะ IPG strip pH 3-10 NL ขนาด 7 ซม., 12.5% เจล เทคนิคการย้อม Coomassie brilliant blue R-250 ปริมาณโปรตีน 300 $\mu$g และชนิดโปรตีนที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

**ตารางที่ 9** ผลการวิเคราะห์ระบุชนิดโปรตีนจากเมล็ดลำไยในระยะ 20 และ 30 สัปดาห์หลังการติดช่อผลด้วยวิธี 2D-gel และเทคนิค LC-MS/MS

| Types | Accession | Calculeted MW (MS) | Score | Sequences | Matches | Expression in physiological disorder syndrome |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **ATP synthase subunit beta** | ATPB NICRU | 53.5 KDa | 43 | 2(1) | 4(2) | decrease |
| **Peroxidase A2** | PERA2 ARMRU | 32.3 KDa | 79 | 2(1) | 6(4) | - |
| **APX** [*Dimocarpus longan]* | AFF18848.1 | 37.4 KDa | 21 | 1(1) | 3(1) | - |
| **WRKY transcription factor 72-3** [*Dimocarpus longan*] | AEO31479.2 | 61.0 KDa | 19 | 2(1) | 2(1) | increase |
| **Ramorin-4 protein** [*Dimocarpus longan*] | AGC39090.1 | 52.5 KDa | 18 | 6(1) | 8(1) | |
| **MYB transcription factor** [*Dimocarpus longan*] | AEK05512.1 | 23.2 KDa | 26 | 3(1) | 3(1) | increase |
| **Actyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit beta** | ACCD_CUCSA | 59.5 KDa | 42 | 2(1) | 2(1) | |
| **Transport inhibitor response 1-like protein** | AKN10574.1 | 72.9 KDa | 21 | 6(1) | 6(1) | |
| **NBS-LRR disease resistance protein NBSS54** [*Dimocarpus longan*] | AKE49469.1 | 93.5 KDa | 20 | 5(1) | 5(1) | |
| **14-3-3 family protein** [*Dimocarpus longan*] | ADD79961.1 | 29.5 KDa | 18 | 8(1) | 7(1) | |
| **Transport inhibitor response 1-like protein** [*Dimocarpus longan*] | AKN10574.1 | 72.9 KDa | 21 | 6(1) | 6(1) | |

# บทที่ 5
# สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาความผิดปกติทางสรีรวิทยาของผลลำไยโดยการบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางสรีรวิทยาของผลมีความแตกต่างกันระหว่างลำไยปกติและลำไยผิดปกติ(เปลือกสีแดง) ของน้ำหนักของผลลำไย ขนาดของผล ขนาดของใบ และสีผลอย่างชัดเจน ปริมาณธาตุสังกะสีและธาตุโบรอนมีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของความผิดปกติทางสรีรวิทยาของผลตั้งแต่ก่อนเกิดความผิดปกติทางสรีรวิทยาของผลในสัปดาห์ที่ 5 หลังการติดผลพบว่ามีค่าโบรอนและสังกะสีต่ำกว่าค่าเกณฑ์มาตรฐาน จนถึงเก็บเกี่ยวและยังเชื่อมโยงกับโปรตีนบ่งชี้ที่พบคือโปรตีน 14-3-3 family protein ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการรับรู้สารอาหาร (nutrient sensing) สำหรับค่าโปรตีนที่แสดงออกพบชนิดของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโต โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต้านทานโรคของพืช และโปรตีนที่เกี่ยวข้องการรับรู้สารอาหาร ในระยะที่เกิดลำไยผิดปกติใน 20-30 สัปดาห์หลังการติดผล ดังนั้นโดยสรุปกระบวนการที่เกิดขึ้นภายในมีส่วนสัมพันธ์กับการแสดงออกภายนอกของลำไยที่ผิดปกติ(เปลือกสีแดง) ได้โดยปริมาณธาตุอาหารในใบของพืชมีส่วนสำคัญในการบ่งชี้การเกิดโรคได้ก่อนการบ่งชี้ด้วยการแสดงออกของโปรตีน

# บรรณานุกรม


เกศิณี ระมิงค์วงศ์. 2546. **การจัดจำแนกไม้ผล**. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่.

ขนิษฐา ชำนาญ. 2558. **การศึกษากระบวนการสกัดโปรตีนจากเมล็ดลำไยสายพันธุ์ดอเพื่อการวิเคราะห์ด้านโปรตีโอมิกส์**. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

ดาวเรือง ศรีกอก. 2530. **ดัชนีการเก็บเกี่ยวและการเก็บรักษาผลลำไยพันธุ์ดอ**. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่.

ตระกูล ตันสุวรรณ. 2533. **วิธีการเก็บเกี่ยวลำไยให้ได้คุณภาพและการปฏิบัติดูแลรักษาต้นลำไยหลังการเก็บเกี่ยว**. รายงานการสัมนาการจัดการเพื่อพัฒนาและแก้ไขปัญหาการผลิตการตลาดลำไย ปี 2533. ณ. สำนักงานเกษตรภาคเหนือ เชียงใหม่.

พาวิน มะโนชัย. 2543. **ลำไย**. สิรินาฎการพิมพ์. เชียงใหม่.

พาวิน มะโนชัย ยุทธนา เขาสุเมรุ ชิติ ศรีตนทิพย์ และสันติ ช่างเจรจา. 2546. **เทคโนโลยีการผลิตลำไย**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ฟิสิกส์เซ็นเตอร์.

พาวิน มะโนชัย ยุทธนา เขาสุเมรุ ชิติ ศรีตนทิพย์ และสันติ ช่างเจรจา. 2547. **เทคโนโลยีการผลิตลำไย**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ.

พิชัย คงพิทักษ์ พงษ์เทพ อัครธนกุล และสาวิตรี มาไลยพันธ์. 2536. **การผสมเกสรของลำไยโดยการใช้ผึ้งเป็นตัวถ่ายละอองเกสร**. การประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 31. น. 640-648.

เพิ่มพูน กีรติกสิกร. 2546. **โบรอน-จุลธาตุอาหารพืช**. ภาควิชาทรัพยากรที่ดินและสิ่งแวดล้อม คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

มงคล ต๊ะอุ่น สันติภาพ ปัญจพรรค์ พัชรี ธีรจินดาขจร และสุทธิพงศ์ เปรื่องค้า. 2546. **แนวทางการจัดการขาดธาตุอาหารโบรอนของมะละกอในแปลงเกษตรกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ**. วารสารศูนย์บริการวิชาการ. 11(3): 32-36.

ยงยุทธ โอสถสภา. 2543. **ธาตุอาหารพืช**. ภาควิชาปฐพี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ยงยุทธ โอสถสภา. 2546. **การให้ปุ๋ยทางใบ**. ภาควิชาปฐพีวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ยงยุทธ โอสถสภา. 2546. **ธาตุอาหารพืช.** พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ยุทธนา เขาสุเมรุ ชิติ ศรีตนทิพย์ และสันติ ช่างเจรจา. 2545. **การแก้ไขปัญหาต้นโทรมของลำไย: ความสัมพันธ์ระหว่างระดับธาตุอาหารในดินและต้นลำไยกับการแสดงอาการต้นโทรม**. รายงานฉบับสมบูรณ์ สถาบันวิจัยและฝึกอบรบการเกษตรลำปาง สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล.

ยุทธนา เขาสุเมรุ ชิติ ศรีตนทิพย์ และสันติ ช่างเจรจา. 2548. **ผลของปุ๋ยไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตการออกดอกและคุณภาพผลผลิตของลำไย**. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. น. 338-341.

รวี เสรฐภักดี. 2540. **การติดผลและการเจริญเติบโตของลิ้นจี่และลำไย**. เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตรเทคโนโลยียุคใหม่ในการผลิตลิ้นจี่และลำไย. สำนักส่งเสริมและฝึกอบรบและศูนย์วิจัยและพัฒนาไม้ผลเขตร้อนและกึ่งร้อน. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. น. 19-41.

วัชรินทร์ จันทวรรณ์ ธีรนุช เจริญกิจ พาวิน มะโนชัย และยุวลี อันพาพรม. 2559. **การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของดอกลำไย 5 สายพันธุ์**. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร. น. 131-140.

วัฒนา เสถียรสวัสดิ์. 2511. **การศึกษาวิธีการผสมเกสรของลำไย**. รายงานความก้าวหน้าประจำปี พ.ศ. 2511. โครงการวิจัยศึกษาปัญหาการออกดอกของลำไย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. น. 23-30.

วินัย วิริยะอลงกรณ์. 2559. **คู่มือการผลิตลำไยสู้ภัยแล้ง**. สาขาไม้ผล คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้. จังหวัดเชียงใหม่.

วีรชัย มาศฉมาดล. 2538. **อาหารก็เป็นยาได้ “ผลไม้”**. นานมีบุ๊คส์จำกัด. กรุงเทพฯ.

ศิริโสภา อินขะ. 2555. **ผลของการใช้ความร้อนต่อโปรตีนในเปลือกผลลำไยระหว่างการสะท้านหนาว**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ พืชสวน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ศุภลักษณ์ สิงหบุตร. 2549. **โรคขาดธาตุอาหารพืช**. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

ศูนย์วิจัยเศรษฐกิจและพยากรณ์ทางการเกษตร. 2553. **ผลการสำรวจความคิดเห็นเรื่อง “เสียงสะท้อนชาวสวนก่อนผลผลิตลำไยออกสู่ตลาด**. คณะเศรษฐศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

สันติ ช่างเจรจา ยุทธนา เขาสุเมรุ และชิติ ศรีตนทิพย์. 2548. **ผลของไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของผลลำไยนอกฤดู.** วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 35(5-6): 409-412.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2562. **เคาะผลพยากรณ์ ลิ้นจี่-ลำไย ภาคเหนือ เผย ผลผลิตเพิ่มเล็กน้อย เริ่มแทงช่อ-ออกดอกแล้ว**. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.oae.go.th/download/prcai/farmcrop/longan.pdf. (14/09/2560).

สุมิตรา ภู่วโรดม. 2544. **การปฏิวัติการใช้ปุ๋ยในไม้ผลการจัดการธาตุอาหารทุเรียน**. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อรัญญา ศรีบุศราคัม. 2555. **คุณค่าของลำไย ไม่ใช่แค่ความหวาน**. สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

อัญชนา จรรยา. 2556. **การวิเคราะห์แบบแผนโปรตีนที่แสดงความผิดปกติทางสรีรวิทยาของลำไยในระยะผลอ่อนด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบหนึ่งมิติ**. มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่.

เอกวิทย์ ตรีเนตร อัจฉรา แกล้วกล้า วินัย วิริยะอลงกรณ์ และอดิศักดิ์ จูมวงษ์. 2560. **รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ การประเมินตัวบ่งชี้โปรตีนสำหรับการระบุกลุ่มอาการจากความผิดปกติทางสรีรวิทยาของผลลำไย**. สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.).

Andreini, C., L. Banci and A. Rosato. 2006. **Zinc through the three domains of life**. J. Proteome Res. 5: 3173–3178.

Barry, D.A. and M.H. Miller. 1989. **Phosphorus nutrition requirement of maize seedings from maximum yield**. Agron. J. 81: 95-99.

Belkhadir, Y., R. Subramaniam and J.L. Dangl. 2004. **Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners**. Curr Opin Plant Biol. 7(4): 391-399.

Boardman, R. and D.O. Mcguire. 1990. **The role of Zine in forest environment, ecosystems and tree nutrition**. EForest Ecol. Mgmt. 37:167-205.

Bourton, W.G. 1982. **Postharvest physiology of food crops**. Longman group London.

Brown J.C. 1979. **Role of calcium in micronutrient stresses of plants**. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 10: 459-472.

Buchanan-Wollaston, V. 1997. **The molecular biology of leaf senescence**. J. Exp. Bot. 48(2) 181-199.

Cakmak I. 2010. **Role of zine in protecting plant cells from reactive oxygen species**. New phytol. 146: 185-205.

Cakmak, I., D. Strbac and H. Marschner. 1993. **Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds**. J. Exp. Bot. 44: 127–132.

Cakmak, I. and V. Romheld. 1997. **Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants**. Plant Soil. 193 : 71-83.

Coleman, J. E. 1998. **Zinc enzymes**. Curr. Opin. Chem Biol. 2: 222–234.

Davidescu, D. and V. Davidescu. 1982. **Evaluation of fertility by Plant and Soil Analysis**. Editura Academiei Romania and Abacus Press England.

Dear, BS. and RG. Weir. 2004. **Boron deficiency in pastures and field crops**. Agfact New South Wales agriculture. 2nd edition. pp. 1-8.

Dell, B. and L. Huang. 1997. **Physiologal response of plant to low boron**. Plant and Soil. 193:103-120.

Dhont, C., Y. Castonguay, J.C. Avice, and F.P. Chalifour. 2006. **VSP accumulation and cold-inducible gene expression during autumn hardening and overwinter of alfalfa**. J. Exp. Bot. 57: 2325-2337.

Franceschi, V. R., V.A. Vittenbach and R.T. Giaquinta. 1983. **Paraveinal mesophyll of soybean leaves in relation to assimilate transfer and compartmentation. Immunohistochemical localization of specific glycopeptides in the vacuol after depodding**. Plant Physio. 72: 568-589.

Freney J.K., K. Spencer and M.B. Jones. 1978. **The diagnosis of sulfur deficiency in wheat**. Aust. J. Agric. 29: 727-738.

Hewitt, E. J., E.G. Fisher and M.C. Candela. 1956. **Factors affecting the activity of nitrate reductase in cauliflower plants**. Ann. Rep. Long Ashton Aes. Sta. 1955:202.

Hu, H., P.B. Brown and J.M. Labavitch. 1996. **Species variability in boron requirement in correlated with cell wall pectin**. J.Exp. Bot. 47: 227-232.

Ishimaru, Y., K. Bashir and N.K. Nishizawa. 2011. **Zn uptake and translocation in rice plants**. J.Exp. Bot. 45: 1829-1835.

Johnson, A.D. and J.G. Simons. 1979. **Diagnostic indices of Zine deficiency in tropical legumes**. J. Plant nutr. 1: 123-149.

Li, Y., X.H. Liu, and W.M. Zhuang. 2001. **Effect of magnesium deficiency on nitrogen metabolism of longan (*Dimocarpus longana* Lour.) seedlings**. J. Plant Nutr. 7: 218-222.

Liu, S.B., X.C. Wang, M.J. Shi, Y. Chen, Z.H. Hu, and W.M. Tian. 2009.**Vegetative storage protein with trypsin inhibitor activity occurs in *Sapindus mukorassi Sapindaceae Deciduous* Tree**. J Integr Plant Biol. 51: 352-359.

Ma, G., R. Wang, C.R.Wang, M. Kato, K. Yamawaki and F.X. Qin. 2009. **Effect of 1 - methylcyclopropene on expression of genes for ethylene biosynthesis enzymes and ethylene receptors in post-harvest broccoli**. Plant Growth Regulation. 57(3): 223-232.

Marschner H. 1986. **Mineral Nutrition f Higher Plants**. London p. 674.

Marschner H. 1995. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. 2nd edition, Academic Press. New York. pp. 201-312.

Menzel, C. M., M.L. Carseldine and D.R. Simpson. 1987. **The effect of leaf age on nutrient composition of non furuiting litchi (*Litchi chinensis* Sonn.)**. J. Hort. Sci. 62(2): 273-279.

Menzel, C. M., M.L. Carseldine and D.R. Simpson. 1988. **The effect of fruiting status on nutrient composition of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) during the flowering and fruiting season**. J. Hort. Sci. 63(3): 547-556.

Muslin, A. J. and J.M.C Lau. 2004. **Differential Functions of 1 4 -3 -3 Isoforms in Vertebrate Development**. Curr. Top. Dev. Biol. 65: 211-228.

Oppenheimer, C. and S. Gazit. 1961. **Zinc deficiency in mango groves in Israel and its correction**. Hort. Adv. 5: 1-12.

Peng, S.J., J.E. Huang, R. CnSheehy, R.M. Laza, X. Visperas, G.S. Zhong, G.S. Centeno and K.G. Cassman. 2004. **Rice yields decline with higher night temperature from global warming**. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 101 (27): 9971-9975.

Prask, J.A. and D.J. Plocks. 1971. **A role of Zine in the structural integrity of the cytoplasmic ribosomes of *Euglena gracilis***. Plant Physiol. 48: 150-155.

Rengel, Z. and R.D. Graham. 1995. **Importance of seed Zn content for wheat growth on Zn-deficient soil**. Vegetative growth. Plant Soil. 173: 259–266.

Robson, A.D. and D.J. Reuter. 1981. **Dignosis of copper deficiency and toxicity**. In Copper in soil and plant. Academic Press, London. pp. 287-312.

Roygrong, S., W. Spreer and V. Romheld. 2016. **Role of boron and zinc in flower induction of Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.)**. International symposium. chiang mai. Thailand. pp. 519-536.

Sarun, P.L. and K. Ratan. 2011. **Boron deficiency disorders in mango (*Mangifera indica*) field screening nutrient composition and amelioration by boron application**. Indian J. Agri. Sci. 81 (6): pp. 506–10.

Shelp, B.J. 1993. **Physiology and biochemistry of boron in plants**. In Boron and Its Role in Crop Production. pp. 53-85.

Singh, B., Y.p. Dang and S.C. Mehta. 1990. **Influence of nitrogen on the behaviour of nickel in wheat**. Plant Soil 127: pp. 213-218.

Smith, F.W., W.A. jackson and P.J. Van. 1990. **Internal phosphorus flows during development of phosphorus stress in *Stylosanthes hamata* Aust**. J. Plant Physiol. 17: pp. 451-464.

Somanahalli, C., Anil Kumar and Y. Raju. 2005. **Boron Deficiency in Mango (*Mangifera indica* L.) A Cause Delineation Study in Acidic Soils of Maharashtra, India**. Soil Sci. and Plant Nutr. 51(5): 751-754.

Staswick, P. E. 1989. **Developmental regulation and the influence of plant sinks on vegetative storage protein gene expression in soybean leaves**. Plant Physio. 89: 309-315.

Taiz, L. and E. Zeiger. 2006. **Plant physiology**. Sinauer A. Sunderland U.S.A.

Thongjoo, C., W. Mektrong, B. Ya-oop, O. Tuntawiroon, W. Kijsomporn, and W. Yeesawat. 2016. **Effect of Calcium-Boron Application on Leaf Nutrient Concentrations and Yield in 'Xichu' and 'Fuyu' Persimmons (*Diospyros kaki* L.)**. Agricultural research and Technology Transfer Center Faculty of Agriculture Kasetsart University. pp. 1-9.

Tongdee, S.C. 1997. **Longan. In S.K. Mitra(ed) Postharvest physiology and storage of torpical and subtropical fruits**. CAB International. New York.

UniProt. 2018a. **Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit beta**. [Online]. Available https://www.uniprot.org/uniprot/QHZA7. (5/12/2019).

Uniprot. 2018b. **L-Ascorbate peroxidase 1**. [Online]. Available https://www.uniprot.org/uniprot/ Q7XVM8. (5/12/2019).

Uniprot. 2018c. **Remorin-4 protein**. [Online]. Available https://www.uniprot.org/uniprot/Q7XVM8. (5/10/2019).

Uniprot. 2018d. **Transport inhibitor response 1-like proteinbeta**. [Online]. Available https://www.uniprot.org/uniprot/ Q7XVM8. (5/10/2019).

Uniprot. 2018e. **WRKY transcription factor 72-3**. [Online]. Available https://www.uniprot.org/uniprot/ G3FF82. (5/10/2019).

Usahakaset. 2005. **Boron**. [Online]. Available http://www.usahakaset.com/boron.html. (5/10/2019).

Wei, Jianfeng., W.D. Liang and S. Chuanzhi. 2007. **Effects of Spraying Potassium Combined with Calcium and Boron on Quality and Storability of Longan Fruits**. J. Agri. Sc. 35(13): 3986-3987.

Wiriyaalongkorn, W., S. Roygrongb, W. Spreerc, S. Ongprasertd, V. Romheldb and T. Müller. 2007. **Effectiveness of micro-nutrient fertilization in off season longan production in Northern Thailand**. Conference on International Agricultural Research for Development. Tropentag University of Kassel-Witzenhausen and University of Göttingen. pp. 1-6.

Zekri, M. and T.A. Obreza. 2003. **Micronutrient Deficiencies in Citrus: Iron, Zine and Manganese**. UF/IFAS Extension. University of Florida. pp. 1-3.

# ภาคผนวก

# ภาคผนวก ก

## ตารางภาคผนวก

**ตารางผนวกที่ 1** อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

| อุปกรณ์ | รุ่น | ยี่ห้อ | ประเทศ |
|---|---|---|---|
| Analytical balance | PB 1502-S | Mettler Toledo | Switzerland |
| Cuvette quartz cell | - | Perkin Elmer | U.S.A |
| Electrophoresis power supply | EPS601 | Amersham Biosciences | Sweden |
| Ettan IPG Strip holder | 7 cm | Amersham Biosciences | Sweden |
| Image Scaner | UTA-1120 | Amersham Biosciences | Sweden |
| Immobilin Drystrip pH 3-10 NL | 7 cm | Amersham Biosciences | Sweden |
| Isoelectric focusing system | Ettan IPG phor II | Amersham Biosciences | Sweden |
| Lambda 25 UV/VIS spectrometer | - | Perkin Elmer | U.S.A |
| Microcentrifuge | MIKRO 20 | Hettich Zentrifugen | Germany |
| Microcentrifuge tube | 1.5 ml | Hycon | U.S.A |
| Micropipette | 0.5-10 $\mu$l | Thermo | U.S.A |
| Micropipette | 5-50 $\mu$l | Thermo | U.S.A |
| Micropipette | 100-1000 $\mu$l | Thermo | U.S.A |
| Micropipette | 1-5 ml | Thermo | U.S.A |
| Orbital sharker | S03 | - | U.K |
| Pipette tip | - | Axygen | U.S.A |
| Platform stirrer | STR 8 | Stuart Scientific | England |
| Micropipette | 100-1000 $\mu$l | Thermo | U.S.A |
| Refrigerator (-20°C) | SNH-0163D11A | Sandenintercool | Thailand |
| pH meter | 713 | Metrohm | Switzerland |
| Vertex | VTX-3000L | - | Japan |
| 1D Gel Electrophoresis (8x9 cm,gel thick hand-cast 1 mm ) | AE-6530 mPAGE | Atto | Japan |
| Amersham ECL Gel Box | - | GE | Sweden |

**ตารางผนวกที่2** สารเคมีใช้ในการทดลอง

| **สารเคมี** | **ความบริสุทธิ์** | **บริษัทผู้ผลิต** | **ประเทศ** |
|---|---|---|---|
| Acrylamide($C_3H_5NO$) | 99.0% | Merck | Germany |
| Ammonium persulfate | 98.5% | Fluka | Fluka |
| Acetic acid | 99.9% | Merck | Germany |
| Aluminiumsulphate octadecahydrate | 51.0-59.0% | Loba | India |
| Bromophenol blue | - | Fluka | Switzerland |
| *β*-mercaptoethanol | 99.0% | Acros | U.S.A |
| Bovin serum albumin | 97.0% | Fluka | Switzerland |
| CHAPS | - | U.S.B | U.S.A |
| Copper(II)sulfatepentahydrate | 98.0% | Univar | Australia |
| Coomassie brilliant blue R 250 | - | Fluka | Switzerland |
| Dithiothreitol, DTT | - | U.S.B | U.S.A |
| Ethanol | 99.9% | Merck | Germany |
| Ethylenediaminetetraacetic acid | | | |
| Folin-ciocalteau's phenol | - | Merck | Germany |
| Formaldehyde | | | |
| Glycerol | - | Carlo Erba | Italy |
| Glycine | - | Fisher | U.K |
| Hydrochloric acid | 37% | Carlo Erba | Italy |
| Iodoacetamide, IAA | - | Amersham biosciences | |
| IPG buffer pH 3-10NL | - | Amersham biosciences | |
| Methanol | 99.8% | Loba | India |
| N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine | 98.5% | Fluka | Switzerland |
| N,N'-methylenebisacrylamide | 98.0% | Fluka | Switzerland |
| Silver nitrate | | | |
| Sodium dodecyl sulfate, SDS | - | Sigma | U.S.A |
| Sodium hydroxide | 99.9% | Merck | Germany |
| 2D Clean-up kit | - | GE | Sweden |
| 2D Quant kit | - | GE | Sweden |

**ภาคผนวก ข**

**การสกัดตัวอย่างโปรตีน**

**การสกัดตัวอย่างโปรตีนในส่วนต่างๆของเมล็ดลำไย เพื่อเข้าสู่เทคนิคโปรตีโอมิกส์ โดยการสกัดโปรตีนในแต่ละส่วนของลำไยประกอบด้วย extraction solution**

ก. สารสกัดเมล็ด สกัดด้วย extraction solution คือ 100 mM tris–HCl pH 8.0, 50 mM L-ascorbic acid, 100 mM KCl, 50 mM disodium tetraborate decahydrate, 1% (v/v) TritonX-100, 2% (v/v) $\beta$-mercaptoethanol และ 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)

1. นำผงเมล็ดลำไย ชั่ง 1.00XX g ลงใน extraction solution 4 ml
2. นำสารละลายมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
3. นำส่วนของสารละลายใสเหนือตะกอนมาเติม 0.1 mM ammonium acetate/methanol 10 ml จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่ -20 ℃ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
4. นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที
5. เก็บส่วนของตะกอนมาล้างด้วย methanol และ $\beta$-mercaptoethanol ใน acetone
6. นำไปอบที่ 60 ℃ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 0.25% SDS ปริมาตร 250 $\mu$l และเก็บรักษาไว้ที่ตู้แช่ -20 ℃ เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

**การเตรียมโปรตีนตัวอย่างด้วย 2D-คลีนอัพ (Clean-up)**

ปิเปต supernatant ปริมาตร 50 $\mu$l ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml เติม precipitant ลงไป 300 $\mu$l ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที เติม co-precipitant ปริมาตร 300 $\mu$l ผสมให้เข้ากันแล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตส่วน supernatant ทิ้งไป จากนั้นค่อยๆเติม co-precipitant ลงไป 40 $\mu$l เพื่อปิดผิวหน้าตะกอน ระวังอย่าให้ตะกอนถูกรบกวน นำหลอด microcentrifuge ไปบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อกำจัดของเหลวที่อยู่ในหลอดปิเปตน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงไป 25 $\mu$l ผสมให้เข้ากัน ตะกอนควรกระจายแต่ไม่ละลายน้ำเติม wash buffer 1 ml ตามด้วย wash additive 5 $\mu$l ผสมให้เข้ากันจนกระทั่งตะกอนกระจายตัวอย่างสมบูรณ์ แล้วนำไปบ่มที่ -20 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาทีปิเปตส่วน supernatant ทิ้งไป แล้วเติม rehydration solution ละลายโปรตีนเก็บรักษาไว้ที่ตู้แช่ -20 °C เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

**การวัดปริมาณโปรตีนจากเมล็ดลำไยด้วยวิธี 2D-ควอนท์ (2D-Quant)**

การทำกราฟมาตรฐานโปรตีนและการหาปริมาณโปรตีนด้วย 2D-ควอนท์

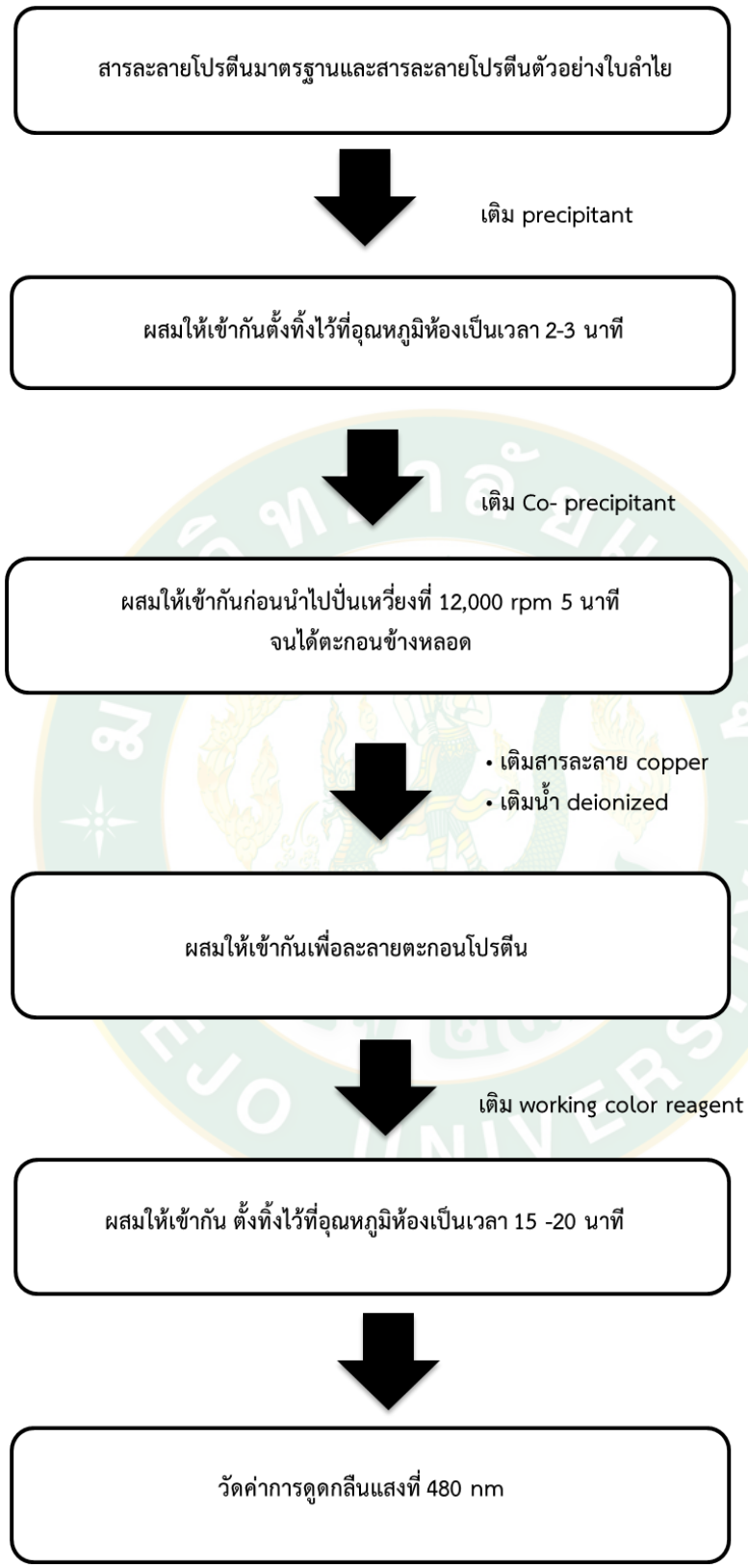
การทำกราฟมาตรฐานโปรตีนเริ่มโดยเตรียมหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml จำนวน 8 หลอด โดยหลอดที่ 1 ไม่เติมสารละลาย BSA (2 mg/ml) ส่วนหลอดที่ 2-6 เติมปริมาตร 5, 10, 15, 20 และ 25 $\mu$l ตามลำดับ สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างของลำไยใช้หลอดที่ 7 และหลอดที่ 8 เติมสารละลายโปรตีนตัวอย่างของเมล็ดลำไยที่เตรียมได้จาก ปริมาตร 4 และ 16 $\mu$l ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 10.

**ตาราง**ที่ 10 ปริมาณของสารละลายโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนตัวอย่างของเมล็ดลำไยที่นำมาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี 2D-Quantification

| สารละลาย | BSA (2 $\mu$g / $\mu$l) | | | | | | สารละลายโปรตีน | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| หลอดที่ | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| ปริมาณ ($\mu$l) | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 4 | 16 |
| ความเข้มข้น ($\mu$g / $\mu$l) | 0 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | - | - |

***หมายเหตุ** – หมายถึง ไม่ทราบความเข้มข้น

หลังจากนั้นในขั้นตอนการศึกษาการหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี 2D-ควอนท์ สารละลายโปรตีนมาตรฐานและสารละลายโปรตีนตัวอย่างเมล็ดลำไย นำมาเติม precipitant ปริมาตร 500 $\mu$l ลงในทุกหลอดผสมให้เข้ากันไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 นาที แล้วเติม co-precipitant ปริมาตร 500 $\mu$l ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm 5 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีนซึ่งจะเห็นเป็นตะกอนเล็กๆ สีขาวที่ข้างหลอดเทของเหลวที่อยู่ในหลอดทิ้งอย่างรวดเร็วเพื่อป้องกันการละลายกลับของตะกอน อาจปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อกำจัดของเหลวออกให้หมด จากนั้นเติมสารละลาย copper ปริมาตร 100 $\mu$l ลงไปตามด้วยน้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 400 $\mu$l ผสมให้เข้ากันเพื่อละลายตะกอนโปรตีน แล้วเติม working color reagent (เตรียมได้จากการผสม color reagent A กับ color reagent B ในสัดส่วน 100:1) โดยเติมหลอดละ 1 ml ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15-20 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 480 nm โดยใช้น้ำกลั่นเป็นค่า Blank แสดงดังในรูปภาพที่ 9.




**รูปภาพที่ 9** ขั้นตอนการศึกษาหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี 2D-ควอนท์ (2D-Quant)

การเปรียบเทียบหาสภาวะที่เหมาะสมของการกระจายตัวของโปรตีนในเมล็ดลำไยพันธุ์ดอเพื่อใช้ในการศึกษารูปแบบของโปรตีนในการเข้าสู่การวิเคราะห์โปรติโอมิกส์ โดยเปรียบเทียบสภาวะเจล 3 เงื่อนไข

เงื่อนไขของเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเนทีฟกับนอน-เนทีฟ

การเตรียม slab gel

1. ต่อชุดแผ่นแก้วสำหรับทำ slab gel ใช้ specers เป็นตัวปรับความหนาของเจลตามความต้องการ (0.75-1.00 ml) คำนวณปริมาณของเจลที่จะใช้โดยที่จะใส่ stacking gel (upper) ที่มีความสูงประมาณ 1 เซนติเมตร เหนือ separating gel (lower) ประกอบชุดติดตั้งเจล แล้วนำแผ่นกระจกที่เตรียมได้ มาทำการ pack ในชุดแต่งตั้งนี้โดยวางกระจกให้ด้านที่เป็นแผ่นกระจกขนาดใหญ่อยู่ด้านใน ส่วนด้านที่เป็นแผ่นกระจกอยู่ด้านนอกเป็นแผ่นกระจกขนาดเล็กแล้วจึงทำการทดสอบการรั่วมาทดสอบการ pack ว่ามีรั่วหรือไม่ด้วยการเติมน้ำลงในชุดติดตั้ง

2. เตรียมสารละลายของเจล (separating gel) ความเข้มข้น 7.5%, 12.5% และ 15% ที่ยังไม่พอลิเมอไรซ์ โดยผสมสารต่างๆ ดังตารางที่ 11.

**ตารางที่ 11** สูตรสำหรับ SDS-PAGE (separating gel 7.5%, 12.5% และ 15%) ต่อ 1 เจล

| สารเคมี | ความเข้มข้นเจล (ml) | | |
|---|---|---|---|
| | 7.5% | 12.5% | 15% |
| Monomer solution (ready gel solution) | 4.7 | 8.0 | 9.4 |
| 4X running gel buffer | 6.3 | 6.3 | 6.3 |
| 10% SDS | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Distilled water | 14 | 10.6 | 9.0 |
| 10% ammonium persulphate* (APS) | 0.125 | 0.125 | 0.125 |
| TEMED | 0.0083 | 0.0083 | 0.0083 |

*เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

หมายเหตุ การเตรียมสภาวะเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเนทีฟ จะไม่เติมองค์ประกอบที่เป็น 10% SDS

3. ค่อยๆ ผสม APS และ TEMED ลงในสารละลายเจลที่ดูดอากาศออกแล้ว ใช้ปิเปตดูดสารละลายเจลนี้ใส่ลงระหว่างแผ่นแก้วที่เตรียมไว้ จากนั้นค่อยๆ หยดน้ำกลั่นให้คลุมผิวของเจลทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 30 นาที เมื่อเจลแข็งตัวจะเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำกลั่นที่คลุมผิวเจลอยู่อย่างชัดเจน

4. เตรียมสารละลาย stacking gel 4% จำนวน 10 ml โดยผสมสารดังตารางที่ 12 เข้าด้วยกันดูดอากาศออกจากสารละลายประมาณ 10 นาที

**ตารางที่ 12** สูตรสำหรับ SDS-PAGE (stacking gel 4%) ต่อ 1 เจล

| สารเคมี | ปริมาตร (ml) |
|---|---|
| Monomer solution | 0.450 |
| 4X stacking gel buffer | 0.750 |
| 10% SDS | 0.030 |
| Distilled water | 1.75 |
| 10% ammonium persulphate (APS) | 0.025 |
| TEMED | 0.010 |

**หมายเหตุ** การเตรียมสภาวะเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเนทีฟ จะไม่เติมองค์ประกอบที่เป็น 10 % SDS

5. ค่อยๆล้างส่วนของ gel ด้วยน้ำกลั่นและดูดน้ำออกให้แห้ง สอดหวี (comb) ขนาด 10 หลุม และความหนา 1.00 mm ลงในเจล plate

6. ใส่ 10% APS จำนวน 50 $\mu$l และ TEMED จำนวน 5.0 $\mu$l ในสารละลายของ stacking gel ที่ดูดอากาศออกแล้วผสมให้เข้ากันแล้วเทลงบน separating gel ระวังอย่าให้มีฟองอากาศเกิดในช่อง comb ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวจะใช้เวลาประมาณ 30-45 นาที

7. ดึง comb ออกจาก stacking gel จะเห็นช่อง (well) สำหรับใส่สารที่ต้องการแยกบนเจล หยอดน้ำกลั่นลงในช่องเพื่อล้างอีกครั้งหนึ่งจากนั้นดูดน้ำออกจนเห็นเป็นช่องๆ

**การเตรียมสารโปรตีนมาตรฐาน**

การทดลองนี้ใช้ standart protein marker ชนิด chromatein prestained protein ladder โดยมีรายละเอียด ดังนี้

| | |
|---|---|
| Code: | PR0602 |
| Lot No: | 7008, 7009 |
| Expiry date: | August, 2015 |
| Pack size: | 2x250 |

ทำการแยกใส่ effendrop tube ในปริมาณ 100 $\mu$l จำนวน 2 หลอดแล้วนำไปเก็บไว้ที่ -20°C โดยเหลือในหลอดไว้เพียง 50 $\mu$l เพื่อใช้ในการทดลองครั้งนี้ (หลังใช้เสร็จให้ทำการเก็บไว้

ที่ -20°C ทันที) การเก็บรักษา (storage condition) ทำการเก็บรักษาไว้ที่ -20°C เพื่อใช้ในการทดลอง 1 ปีสำหรับ recommended load volume ในงานวิจัยครั้งนี้ใช้ 4 $\mu$l

**การเตรียมสารละลายตัวอย่างโปรตีนจากเมล็ดลำไยเพื่อใช้ในการเข้า SDS-PAGE**

การเตรียม stock SDS sample buffer สำหรับตัวอย่างชนิด reducing protein solution ดังตารางที่ 13

**ตารางที่ 13** สูตรสำหรับ stock SDS sample buffer สำหรับตัวอย่างชนิด reducing protein solution

| สารเคมี | ปริมาตร (ml) |
|---|---|
| Distilled water | 4.8 |
| 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 | 1.2 |
| 10% SDS | 2.0 |
| Glycerol | 2.0 |
| 0.5% Bromophenol blue | 0.8 |
| $\beta$-mercaptoethanol | 0.050 |

**หมายเหตุ** การเตรียมสภาวะตัวอย่างแบบนอน-รีดิวซิง จะใช้การเตรียมเหมือนในตารางไม่มีการเติม $\beta$-mercaptoethanol และการเติมเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเนทีฟ จะไม่เติมองค์ประกอบที่เป็น 10 % SDS

ขั้นตอนการเตรียมผสมสารละลายตัวอย่างโปรตีนเมล็ดลำไยกระทำโดย นำโปรตีนที่สกัดได้และผ่านขั้นตอน clean-up จำนวน 50 $\mu$l ( โดยไม่ผ่านการเจือจาง ) มาผสมกับใน loading buffer ใน 50 $\mu$l อัตราส่วน 1:1 ในหลอด centrifuge tube ทำการปิดฝาหลอด จากนั้นทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วทำการปั่นเหวี่ยงตะกอน 1 นาทีที่ความเร็วรอบต่ำนำสารละลายที่ได้เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 $^{\circ}$C

**การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส**

1. ต่อชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม tank buffer (0.025 M Tris, 0.192 M glycine, 0.1% SDS pH 8.3) ลงใน chamber

2. ใส่โปรตีนที่คำนวณได้ลงในช่องบน stacking gel โดยทำการใส่ standard protein หลุมปลายด้านซ้าย 4 $\mu$l แล้วเว้นระยะไว้ 1 หลุม ส่วนหลุมถัดมาใส่สารละลาย egg

albumen ส่วนหลุมถัดปใส่สารละลายตัวอย่างโปรตีนจากใบและเปลือกทั้ง 2 เงื่อนไขได้แก่ รีดิวซิงกับนอน-รีดิวซิง ตามลำดับ หลุมละ 20 $\mu$g (ส่วนปริมาตรจะใช้แต่ละหลุมได้จากการคำนวณ)

3. ต่อขั้วบวกกับ chamber ล่าง และขั้วลบเข้า chamber บน เปิดสวิทซ์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยใช้กระแสคงที่ที่ 20 mA (สำหรับเจลเดียวถ้า 2 เจลใช้ 40 mA) โดยการปรับค่า V ไว้ที่ 250 ที่อุณหภูมิห้อง

4. ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าเมื่อเห็นสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่มาจงถึงปลายล่างของเจลซึ่งใช้เวลาประมาณ 1.5 ชั่วโมง

5. นำแผ่นแก้วออกจาก chamber และนำแผ่นเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นแก้วออกมาวางบนถาดเพื่อตรวจสอบหาตำแหน่งและปริมาณของโปรตีนต่อไป

**การย้อมสีโปรตีนในเจล**

หลังจากสิ้นสุดการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสนำแผ่นเจลแช่ในสารละลายสีย้อมโปรตีนโดยวิธีการย้อมสีโดยวิธี coomassie brilliant blue R-250

วิธีนี้เป็นวิธีมาตรฐานและใช้กันแพร่หลายสำหรับโปรตีนทั่วไป แถบที่มีโปรตีน 0.1-1 $\mu$g จะให้สีน้ำเงินที่ชัดเจน มีวิธีการดังนี้

1. ตรึงโปรตีนในเจลด้วยสารละลาย (50% methanol, 10% acetic acid) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2. เตรียม staining solution คือ coomassie brilliant blue R-250 1.25 g, methanol 250 ml, acetic acid 50 ml ในน้ำกลั่น 200 ml เมื่อสีละลายกรองด้วยกระดาษกรอง สาระลายนี้เมื่อใช้แล้วสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีก

3. ค่อยๆ นำเจลบนแผ่นแก้วมาใส่ในถาดที่มี staining solution ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที แล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นก่อน 3 ครั้งก่อนล้างสี

4. ล้างสี ด้วยสารละลาย 25% methanol, 7% acetic acid เปลี่ยน สารละลายที่ใช้ล้างสีหลายๆครั้ง จนเห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีนอย่างชัดเจน

**เงื่อนไขเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบต่อเนื่องกับไม่ต่อเนื่อง**

สำหรับการเตรียมเจลอิเล็กโทรฟรีซิสแบบต่อเนื่องใช้วิธีการเตรียมเจลตามวิธีดัดแปลงของ John และคณะ (2002) โดยมีขั้นตอนต่อไปนี้

**แบบที่ 1 การเตรียม slab gel อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบต่อเนื่องชนิด manual**

1. เตรียมเครื่องมือ slab gel

2. เตรียมสารละลายของเจลแบบ gradient SDS-PAGE โดยใช้สารละลาย A และ B ที่ยังไม่ polymerlize โดยผสมสารต่างๆ ดังตารางที่ 14

**ตารางที่ 14** สูตรสำหรับเจลแบบ gradient SDS-PAGE โดยใช้สารละลาย A และ B ต่อ 1 เจล

| สารเคมี | สารละลาย A (ml) | สารละลาย B (ml) |
|---|---|---|
| Monomer solution (ready gel solution) | 2.5 | 10.0 |
| 1.875 M Tris – HCl,pH 8.8 | 3.0 | 3.0 |
| Distilled water | 9.3 | 0.6 |
| 10% SDS | 0.15 | 0.15 |
| 10% ammonium persulphate* (APS) | 0.05 | 0.05 |
| Sucrose (g) | - | 2.2 |

**หมายเหตุ** การเตรียมสภาวะเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเนทีฟ จะไม่เติมองค์ประกอบที่เป็น 10 % SDS

3. ค่อยๆ ผสม APS และ TEMED ลงในสารละลายเจลที่เตรียมไว้แล้วทั้งสารละลาย A และสารละลาย B โดยทำการปรับหมุน magnetic bar และเปิดท่อผสมละลายระหว่างสาร A และสาร จากนั้น ดูดสารละลายเจลนี้ใส่ลงระหว่างแผ่นแก้วที่เตรียมไว้ด้วยเครื่อง peristaltic pump หรือหากไม่มีเครื่อง peristaltic pump ให้ใช้การปรับอัตราการไหลโดยอาศัยแรงโน้มถ่วงของโลก

4. ปรับอัตราการไหลโดยอาศัยแรงโน้มถ่วงของสารละลายผสม A และ B ให้ได้อัตรา 5 ml/min ลงในแผ่นกระจกจนได้ระยะ 1 cm จากด้านบน จากนั้นค่อยๆหยดน้ำกลั่นให้คลุมผิวเจลทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 30 นาทีเพื่อให้เจลแข็งตัวเกิดสภาวะ gradient gel จะเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำกลั่นที่คลุมผิวเจลอยู่ชัดเจน

5. เตรียมสารละลาย stacking gel 4% เหมือนในตารางที่ 2.5 ค่อยๆล้างส่วนของ gel ด้วยน้ำกลั่นและดูดน้ำออกให้แห้ง สอด comb ขนาด 10 หลุม และความหนา 0.75 mm ลงในเจล plate

6. ใส่ 10% APS จำนวน 50 $\mu$l และ TEMED จำนวน 5.0 $\mu$l ในสารละลายของ stacking gel ที่ดูดอากาศออกแล้วผสมให้เข้ากันแล้วเทลงบน separating gel ระวังอย่าให้มีฟองอากาศเกิดในช่อง comb ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวจะใช้เวลาประมาณ 30-45 นาที

7. ดึง comb ออกจาก stacking gel จะเห็นช่อง (well) สำหรับใส่สารที่ต้องการแยกบนเจล หยอดน้ำกลั่นลงในช่องเพื่อล้างอีกครั้งหนึ่งจากนั้นดูดน้ำออกจนเห็นเป็นช่องๆ

8. สำหรับการใส่สารละลายโปรตีนตัวอย่างเมล็ดลำไยทั้งในเงื่อนไข reducing และ non- reducing

**แบบที่ 2 การเตรียม slab gel อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบต่อเนื่องชนิดชนิด ready**

สำหรับ การเตรียม slab gel แบบ continues electrophoresis ชนิด ready มีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียม 1×running buffer โดยเจือจาง 19 ml Amersham ECL gel running buffer, 10× ในน้ำ 171 ml ซึ่ง buffer ที่เตรียมได้นี้เพียงพอสำหรับหนึ่งเจล

2. เติม 90 ml ของ 1×running buffer ลงไปไปยังแต่ล่ะข้างของ Amersham ECL box ทำการเปิดถุงเจลสำเร็จ Amersham ECL 4-20%

3. วางเจล Amersham ECL ลงในน้ำกลั่นและแกะเทปด้านข้างของเจลออก

4. วาง Amersham ECL เจลใน Amersham ECL gel box เพื่อให้ทั้งด้านข้างของหน้าเจลที่มีต่อขั้วลบ (-) และอีกข้างหนึ่งต่อกับขั้วบวก (+)

5. ทำการปิดฝาด้านบนของ Amersham ECL gel เชื่อมต่อกับแหล่งจ่ายไฟ โดยตั้งค่าเริ่มต้นใช้ศักย์ไฟฟ้าต่อหนึ่งเจล 12 นาทีที่ 160 V เมื่อรันเสร็จปิดเครื่องพร้อมสำหรับใส่ตัวอย่าง

6. ทำการเกะ comb สำเร็จออกจากเจลสำเร็จแล้วเติม 6 ml 1×running buffer ใน well container

7. ผสมตัวอย่างกับ sample buffer loading 1:1 ในปริมาณ 20 $\mu$g พร้อม standard protein marker 5 $\mu$l

8. ทำการปิดฝาด้านบนของ Amersham ECL gel เชื่อมต่อกับแหล่งจ่ายไฟ โดยตั้งค่าเริ่มต้นใช้ศักย์ไฟฟ้าต่อหนึ่งเจล 60 นาทีที่ 160 V เมื่อรันเสร็จจึงทำการปิดเครื่อง

**เงื่อนไขเปรียบเทียบอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบ 1 มิติกับ 2 มิติ**

สำหรับการเตรียมเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบ 2 มิติ (2D-gel) เพื่อใช้เปรียบเทียบกับผลเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบ 1 มิติ (1D-gel)ใช้วิธีการเตรียมเจลตามวิธีการดัดแปลงของ GE healthcare และคณะ (2004) โดยมีขั้นตอนต่อไปนี้

**การแยกโปรตีนในมิติที่ 1 ด้วยวิธี IEF**

เตรียมสารละลายสำหรับทำ IEF ปริมาตร 125 $\mu$l ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนตัวอย่าง 100 $\mu$g, 20 mM DTT, 0.8% v/v IPG buffer และ rehydration stock solution (การคำนวณ

แสดงไว้ในภาคผนวก ข) หลังจากผสมองค์ประกอบทั้งหมดแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงแบบ quick spin 20 วินาที ปิเปตสารละลายที่เตรียมไว้ลงไปใน strip holder ขนาด 7 cm โดยค่อยๆปล่อยสารละลายจากขั้วบวกไปขั้วลบจนได้ระยะทาง 2 ใน 3 ของ strip holder ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ

เตรียม IPG strip (pH 3-10 NL ขนาด 7 cm) โดยใช้ forceps ลอกพลาสติกที่ติดอยู่กับ IPG strip ออก (ลอกจากบวกไปหาลบ) ระวังอย่าจับส่วนที่เป็นเจล วาง strip ลงใน strip holder โดยคว่ำหน้าเจลลง (ต้องอ่านตัวเลขที่อยู่บน IPG strip ได้) ระวังอย่าให้เกิดฟอง ปิดผิวหน้า strip ด้วย dry strip cover fluid เพื่อป้องกันการระเหยและตกผลึกของยูเรีย ระหว่างทำ IEF จากนั้นปิดฝาของ strip holder แล้วนำไปวางบนเครื่อง Ettan IPGphor II

ตรวจสอบให้แน่ใจว่าขั้วบวกและขั้วลบของ electrode ใน strip holder อยู่ตรงกับพื้นที่ขั้วบวกและขั้วลบของ electrode ในเครื่อง IPGphor II จากนั้นปิดฝาเครื่อง แล้วตั้งโปรแกรมทำ IEF ดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| Prot#1 | 7 cm | pH 3-10 NL |
| Rehydration 12:00 hr. | | @ 20°C |
| IEF | @ 20°C | 50 µA/strip |
| 2 | | strips 5 steps |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Step 1 step and hold | 150 V | 200 | V/hr. |
| Step 2 step and hold | 300 V | 200 | V/hr |
| Total | | 11,700 | V/hr |
| Step 3 Gradient | 1000 V | 300 | V/hr |
| Step 4 Gradient | 5000 V | 4500 | V/hr |
| Step 5 step and hold | 5000 V | 6500 | V/hr |

เมื่อเริ่มทำ IEF ให้กดปุ่ม start หน้าจอเครื่อง IPGphor II จะปรากฏข้อความดังนี้

| | |
|---|---|
| Running Prot#1 | |
| Rehydration for | 12:00 hr |
| 0:00 hr. | Elapsed |
| Rehydration at 20°C | |

และเมื่อเสร็จสิ้นการทำ IEF หน้าจอเครื่อง IPGphor II จะปรากฏข้อความดังนี้

| Run ended at | | |
|---|---|---|
| 5000 V | 11,701 Vhr | total |
| 28 $\mu$A | 5:33 hrs | total |
| Press STOP to reset | | |

กดปุ่ม Stop แล้วเปิดฝาเครื่องเพื่อนำ strip ออกจาก strip holder ไปทำการแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ต่อไป

**การแยกโปรตีนในมิติที่ 2 ด้วยวิธี SDS-PAGE**

1. การเตรียมเจลสำหรับทำ SDS-PAGE

ประกอบอุปกรณ์ของเครื่อง Atto AE-6530 โดยเริ่มจากการประกบ plain glass plate กับ 1 mm glass plate เข้าด้วยกัน แล้ววางลงใน module โดยให้แผ่น 1 mm glass plate อยู่ด้านในจากนั้นจัดกระจกทั้งสองให้ขอบเท่ากันก่อนที่จะยกที่ยึด (clips) ทั้งสองด้านมาอยู่ในตำแหน่งด้านข้างทดสอบการตั้งของแผ่นกระจกกับพื้นและอาจเติมน้ำกลั่นลงไปในช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสองเพื่อตรวจสอบการรั่วของ module

ปิเปต acrylamide solution ความเข้มข้น 15% แบบ ready gel ดังตาราง 2.4 ที่เตรียมไว้ใส่ลงในช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสองจนกระทั่งระดับของสารละลายอยู่ต่ำกว่าขอบกระจกด้านบนประมาณ 1 cm (ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ) จากนั้นปิดผิวหน้าเจลทันที่ด้วยน้ำ deionized แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 1 ชั่วโมง ก่อนเทน้ำออกเพื่อนำเจลไปใช้ทำ SDS-PAGE หรือเก็บเจลไว้ใช้ภายหลังโดยปิดผิวหน้าเจลด้วย gel storage solution แล้วนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4-8 °C

2. การ equilibrate IPG strip ก่อนทำ SDS-PAGE

เตรียมหลอด centrifuge ขนาด 15 ml 2 หลอด โดยหลอดที่ 1 มี 0.05 g DTT และหลอดที่ 2 มี 1.25 g IAA จากนั้นเติม SDS equilibration buffer 5 ml ลงไปในแต่ละหลอดเพื่อละลายสารที่อยู่ในหลอด นำ IPG strip ที่ผ่านการทำ IEF แล้ว มาใส่ในหลอดที่ 1 โดยหันด้านพลาสติกแนบกับข้างหลอดด้านในแล้วนำไปวางบนเครื่องโยกเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นย้าย IPG strip มาใส่ในหลอดที่ 2 แล้วนำไปวางบนเครื่องโยกเป็นเวลา 15 นาที

3. การนำ strip ใส่เครื่อง Atto AE-6530 และทำ SDS-PAGE

แช่ IPG strip ที่ได้จาก 2 ใน 1X SDS electrophoresis running buffer (tank buffer) เป็นเวลา 5-10 นาที เพื่อล้าง glycerol ที่เป็นองค์ประกอบใน SDS equilibration buffer

ออก แล้ววาง strip ลงบนเจลที่เตรียมไว้ (จากข้อ 1) โดยให้ด้านพลาสติกแนบติดกับกระจกด้านนอก (rectangular plate) และให้ด้านบวกอยู่ซ้าย (ต้องอ่านตัวเลขบน IPG strip ได้) เตรียม protein marker ปริมาตร 6.0 $\mu$l ลงบนกระดาษกรอง (ขนาด 3×5 mm) แล้วทิ้งไว้จนแห้ง จากนั้นวางกระดาษกรองลงตรงช่องว่างด้านซ้ายของ IPG strip แล้วปิดผิวหน้า IPG strip ด้วย agarose sealing solution

ปลดล็อก sealing plateของ module ให้อยู่ในระดับล่างสุดก่อนนำมาใส่ใน electrophoresis chamber เติม 1X SDS electrophoresis running buffer ในช่องว่างของ module ให้ท่วมขอบบนกระจกด้านใน แล้วเติม bufferชนิดเดียวกันลงใน chamber ให้อยู่เหนือขีดที่บอกระดับต่ำสุด กำจัดฟองอากาศที่อยู่ขอบกระจกทั้งด้านบนและล่าง ตรวจขั้วกระแสไฟของ module ว่าแห้งสนิทก่อนการปิดฝา ต่อสายไฟเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply) แล้วติดตั้งโปรแกรมการทำ SDS-PAGE ดังนี้

| | |
|---|---|
| Step 1: current 10 mA/gel | 0:15 hr. |
| Step 2: current 20 mA/gel | 1:30 hr. |
| Max 150 V and 100 W | |

เมื่อตั้งโปรแกรมทั้ง 2 ขั้นตอนเสร็จ หน้าจอเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าจะปรากฏข้อความตามลำดับดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| SET: | $P1^A$ | 0:15 hr. |
| 150 V | 10 mA | 100 W |

และ

| | | |
|---|---|---|
| SET: | $P2^A$ | 1:30 hr |
| 150 V | 20 mA | 100 W |

กดปุ่ม Run เพื่อเริ่มทำการ SDS-PAGE ในขั้นตอนแรก เมื่อเสร็จสิ้นตามเวลาที่กำหนด ให้กดปุ่ม stop ตามด้วย set เพื่อเปลี่ยนโปรแกรมเข้าสู่ขั้นตอนที่ 2 ซึ่งในขั้นตอนนี้ให้สังเกตแถบของ bromophenol blue (tracking dye) หรือแถบสีน้ำเงินแรกของโปรตีนมาตรฐานชนิด pre-stainเคลื่อนลงมาห่างจากขอบเจลด้านล่าง 5 mm ให้กดปุ่ม stop เพื่อหยุดการทำงานของเครื่องซึ่งจะปรากฏข้อความบนหน้าจอเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| END: | $P2^A$ | 1:02 hr. |
| 150 V | 34.5 mA | 11 W |

จากนั้นปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าแล้วนำเจลออกจากเครื่อง Atto AE-6530 ใส่กล่องพลาสติกใสสำหรับย้อมสีเจลด้วยวิธี coomassie brilliant blue R-250 เพื่อตรวจหาจุดโปรตีนบนเจลต่อไป (ย้อมโปรตีนในเจลเหมือนขั้นตอนการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ 1 มิติ) แล้วจึงนำเจลที่ได้ไปสแกนเพื่อวิเคราะห์ภาพเจลต่อไป

**การบันทึกข้อมูล**

**การวิเคราะห์เจลสำหรับเทคนิค 2D-gel**

สำหรับการวิเคราะห์เจลด้วยเทคนิค 2D-gel จะมีการวิเคราะห์ 2 ส่วนคือค่า pI ของโปรตีน จะอาศัยการประมาณในตำแหน่งแนวแกนนอนของเจลที่มีช่วง pH 3-10 ส่วนการประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนจะใช้วิธีเหมือน 1D-gel โดยการวัดผลเจล 2 วิธีดังนี้
การวัดผลของเจลโดยวิธีคำนวณ

1. นำเจลมาวัดระยะทางของ tracking dye จากบริเวณเริ่มต้นก่อนการย้อมสี หลังจากย้อมสีแล้วจึงวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีน นำระยะทางการเคลื่อนที่มาคำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative migration, $R_f$) ของโปรตีนแต่ละชนิด

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนจากจุดเริ่มต้น}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของ tracking dye จากจุดเริ่มต้น}}$$

2. นำค่า Rr ของโปรตีนมาตรฐาน และค่า $\log_{10}$ มวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานมาเขียนกราฟมาตรฐาน จากนั้นนำค่า $R_f$ ที่วัดได้จากตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานจะสามารถทราบมวลโมเลกุลของโปรตีนจากใบลำไยที่เราทำการวิเคราะห์ได้

**การวิเคราะห์เจลสำหรับเทคนิค 2D-Gel ด้วยเครื่องมือ**

เจลที่ได้จากการศึกษาโปรตีนในใบลำไยสายพันธุ์ดอด้วยเทคนิค 1D-gel จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ Gel documentation system และหาคุณสมบัติของโปรตีนในเจล (ค่า MW) ด้วยโปรแกรม Image Quant TL version 2.0

ส่วนการศึกษาด้วยเทคนิค 2D-gel ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ Image Sanner และหาคุณสมบัติของโปรตีนในเจล (ค่า pH และ MW) ด้วยโปรแกรม Image Master 2D Platinum version 5.0

# ประวัติผู้วิจัย

**ชื่อ-สกุล** อังคณา เปี่ยมพร้อม

**เกิดเมื่อ** 18 มกราคม 2537

**ประวัติการศึกษา** พ.ศ. 2559 วิทยาศาสตร์บัณฑิต(เทคโนโลยีการเกษตร) สาขาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

พ.ศ. 2555 มัธยมศึกษาตอนปลาย ณ โรงเรียนสตรีมารดาพิทักษ์ อ.เมือง จ.จันทบุรี