บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ผักกาดขาวปลี (Chinese cabbage) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Brassica campestris* subsp. *pekinensis* (Li , 1981) อยู่ใน ตระกูล (Family) Cruciferae สกุล (Genus) Brassica ซึ่งในสกุลนี้ มีประมาณ 40 ชนิด (species) (Purseglove , 1968) มีทั้ง annual และ biennial เช่น กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก คะน้า เป็นต้น

พืชในกลุ่ม *B. campestris* มีถิ่นกำเนิดแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ตะวันออกกลาง ของเอเชีย อัฟกานิสถาน อิหร่าน และทางทิศตะวันตกของประเทศปากีสถาน หลังจากนั้นได้มีการนำไปปลูกในภาคเหนือของทวีปยุโรปและประเทศจีนมากกว่า 2 ,000 ปี (จานุลักษณ์ , 2536) ซึ่งพืชในกลุ่มนี้สามารถแยกออกเป็นชนิดย่อย (subspecies) ต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ (Opena *et al.* , 1988)

B. campestris subsp. *chinensis* : pak choi และ กวางตุ้ง

B. campestris subsp . *narinosa* : broad beaked mustard

B. campestris subsp. *nipposinica*

B. campestris subsp. *olei fera* : turnip และ rape

B. campestris subsp. *parachinensis* : choy sum

B. campestris subsp. *pekinensis* : ผักกาดขาวปลี

B. campestris subsp. *pervirdis* : mustard spinach , tendergreen

B. campestris subsp. r*apifera* or *rapa*

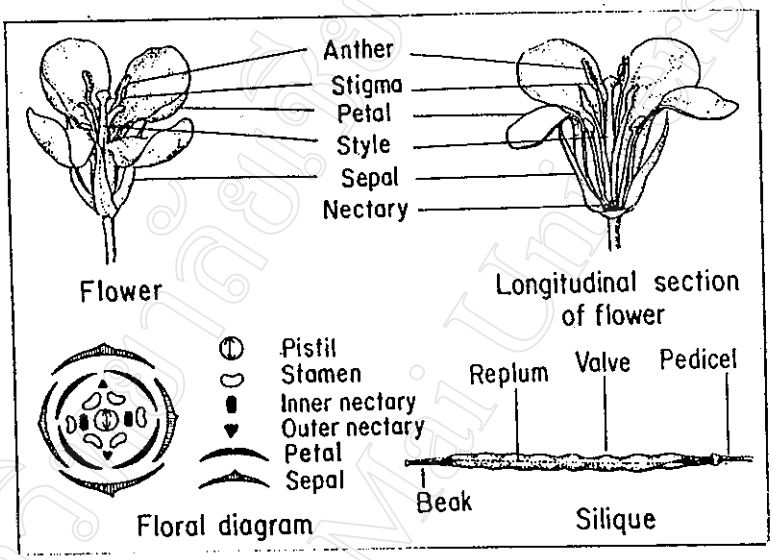
B. campestris subsp. *trilocularis* : sarson

B. campestris subsp. *utilis*

อย่างไรก็ตามมีเพียง 2 กลุ่มเท่านั้นที่มีความสำคัญ ได้แก่ subsp . *chinensis* subsp. *pekinensis*

ผักกาดขาวปลีจัดเป็นพืชฤดูเดียว (annual) มีช่อดอกแบบ raceme ดอกจัดเป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีกลีบเลี้ยง 4 กลีบ กลีบดอก 4 กลีบมีสีเหลือง อับละอองเกสร 6 อัน เป็นแบบ tetradynamus ก้านชูเกสรตัวเมีย 1 อัน และยอดเกสรตัวเมีย 1 อัน รังไข่เป็นแบบ superior ovary ผลเป็นแบบ silique เมื่อแก่มีสีน้ำตาลอ่อน หรือเหลือง (รูปที่ 1) จำนวนเมล็ด 1 – 20 เมล็ดต่อฝัก

เมล็ดมีสีน้ำตาล น้ำตาลแดง จนถึงดำ (Purseglove , 1968) โดยผักกาดขาวปลีต้องการอุณหภูมิต่ำ 5 – 10 องศาเซลเซียส ติดต่อกัน 15 – 20 วันในการกระตุ้นให้เกิดตาดอก และถึงแม้ว่าดอกจะเป็นดอกสมบูรณ์เพศ แต่โดยธรรมชาติแล้วเป็นพืชผสมข้ามเนื่องจากมีลักษณะการผสมตัวเองไม่ติด (self - incompatibility) ชนิด sporophytic system ซึ่งควบคุมโดย S – alleles (Clark and Kao , 1994)



รูปที่ 1 ส่วนประกอบของดอกผักกาดขาวปลี (Opena *et al.*, 1988)

การจำแนกผักกาดขาวปลี

ผักกาดขาวปลีสามารถจำแนกออกตามลักษณะรูปร่างปลี และแหล่งกำเนิดได้ดังต่อไปนี้ (รูปที่ 2) (Li , 1981)

1. Type D_1 - Ovate type :

หัวเป็นแบบ ovate ปลายใบชนกันแต่ไม่ซ้อนกัน มีอัตราส่วนของความสูงต่อเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5 จุดศูนย์กลางของแหล่งกำเนิดอยู่ที่ Shandong Pensla ทางตะวันออกของจีน

2. Type D_2 - Flat - topped type :

หัวเป็นแบบรูปกรวยคว่ำ (invert conical) ปลายใบซ้อนกันอัตราส่วนระหว่างความสูงต่อเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 จุดศูนย์กลางของแหล่งกำเนิดอยู่ที่ Ho – Nan

3. Type D_3 - Cylindrical type :

ลักษณะการเข้าหัวเป็นรูปทรงกระบอก ปลายใบชนกัน แต่ไม่ซ้อนกันอัตราส่วนระหว่างความสูงต่อเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4 จุดศูนย์กลางของแหล่งกำเนิดอยู่ที่ Ho – Pei

4. Type D_1D_2 - Flat – topped ovate form :

ลักษณะหัวเป็นแบบ ovate แต่ตรงปลายจะแบนปลายใบซ้อนกัน เข้าหัวแน่น คุณภาพการเก็บรักษาดี เป็นลูกผสมระหว่าง D_1 และ D_2

5. Type D_1D_3 - Stout cylindrical form :

ลักษณะการเข้าหัวดีมาก อัตราส่วนความสูงต่อเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 ให้ผลผลิตสูง แต่เป็นพันธุ์หนักเป็นลูกผสมระหว่าง D_1 และ D_3

6. Type D_2D_3 - Flat – topped cylindrical form :

หัวมีขนาดใหญ่ ตรงปลายแบนใหญ่ ส่วนตรงโคนจะเรียวอัตราส่วนความสูงต่อเส้นผ่าศูนย์กลางมาก หรือเท่ากับ type D_1D_3 สามารถเจริญได้ในบางพื้นที่เท่านั้น

7. Type C - Fluffy - topped heading type :

การเข้าหัวค่อนข้างแน่น แต่ปลายใบไม่ปิด มีลักษณะฟู

8. Type C D_1 - Fluffy - topped ovate head form :

การเข้าหัวแน่น หัวอ้วน แต่ตรงปลายกลวง เป็นลูกผสมระหว่าง C และ D_1 จุดศูนย์กลางแหล่งกำเนิดอยู่ทางตะวันออกของประเทศจีนแถบชายฝั่งสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพทางภูมิอากาศที่ไม่ดีได้ และเจริญได้ในสภาพที่กว้างขวาง

9. Type C D_3 – Fluffy - topped cylindrical form :

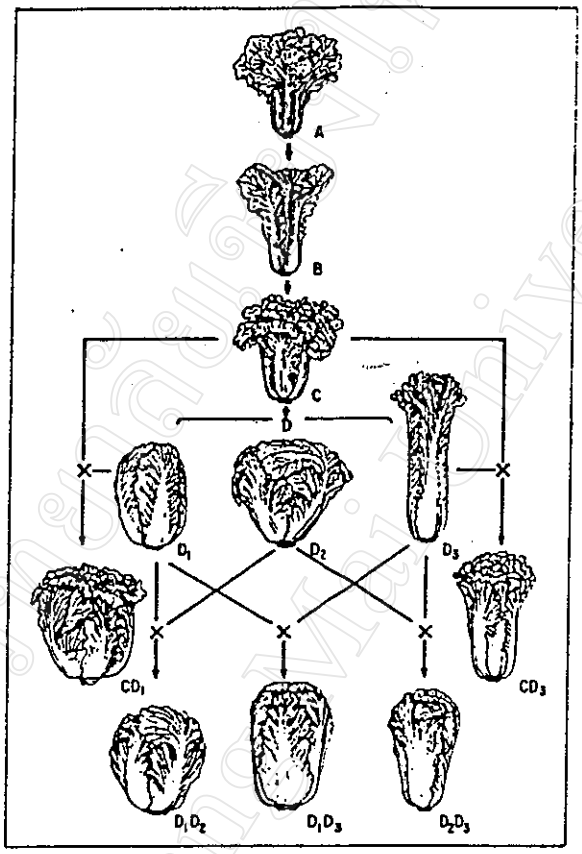
หัวเป็นแบบรูปทรงกระบอก ปลายหลวมเป็นปุยเป็นลูกผสมระหว่าง C และ D_3 สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพภูมิอากาศไม่ดีได้สูง และสามารถเจริญได้ในทุกสภาพสิ่งแวดล้อม

สำหรับผักกาดขาวปลีที่ปลูกในประเทศไทยแบ่งออกได้ 3 ประเภทใหญ่ ๆ (เมืองทองและสุรีรัตน์ , 2532) คือ

1. พันธุ์เข้าปลียาว หรือ พวกไซลินดริคา (cylindrica) ลักษณะทรงสูง ได้แก่ ผักกาดหางหงส์

2. พันธุ์เข้าปลีกลมแน่น หรือพวกเซพฟาลาทา (cephalata) ลักษณะทรงสั้นกว่า อ้วนกลมกว่า อายุการเก็บเกี่ยวนานกว่าพวกเข้าปลีหลวม

3. พันธุ์เข้าปลีหลวมหรือไม่ห่อปลี หรือพวกแลกซา (laxa) อายุการเก็บเกี่ยวสั้นประมาณ 45 วัน



รูปที่ 2 วิวัฒนาการของผักกาดขาวปลี (*B. campestris* ssp. *pekinensis*) (Li , 1981)

A. var. *dissoluta*

B. var. *infarcta*

C. var. *laxa*

D. var. *cephalata*

D_1. f *ovata*

D_2. f *depressa*

D_3. f *cylindrica*

CD_1. var. *laxa* x f *ovata*

CD_3. var. *laxa* x f *cylindrica*

D_1D_2. f *ovata* x f *depressa*

D_1D_3. f *ovata* x f *cylindrica*

D_2D_3. f *depressa* x f *cylindrica*

การปรับปรุงพันธุ์เพื่อการผลิตลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ใช้หลักการผสมตัวเองไม่ติด เริ่มขึ้นประมาณปี 1940 ดร. U ที่ Takii Nagaoka Experimental Farm ได้ศึกษาลักษณะ พันธุกรรมของลักษณะการผสมตัวเองไม่ติด ตามหลักของพันธุศาสตร์ จนได้ลักษณะที่คงที่แล้วขยายสายพันธุ์พ่อแม่ด้วยเมล็ด และได้ผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 ชื่อ O. S. cross ซึ่งขายดีมากหลังสงครามโลกครั้งที่ 2 ในการผลิตลูกผสมชั่วที่ 1 ของ ดร. U นี้มีจุดประสงค์เพื่อทำความบริสุทธิ์แก่พันธุ์ ๆ เดียวมากกว่า การผลิตลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างต่างพันธุ์ เพราะพืชตระกูลกะหล่ำในทางปฏิบัติไม่อาจทำให้เป็นสายพันธุ์แท้ได้ เนื่องด้วยถ้าผสมตัวเองแล้วจะ อ่อนแอ แต่พันธุ์กะหล่ำปลีลูกผสมชั่วที่ 1 พันธุ์แรกของโลกที่เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์สองพันธุ์ คือ พันธุ์ Suteki ซึ่งได้จากพันธุ์ Succession กับ Nakano Wase ของบริษัท Sakata ในปี 1938 (Shinohara , 1981) และหลังจากนั้นมา การปรับปรุงพันธุ์วิธีนี้ก็ได้รับความนิยมกันอย่างแพร่หลาย เช่น Yuhua *et al.* (1996) ได้ทำการปรับปรุงพันธุ์กะหล่ำปลีจนได้พันธุ์ Chumbao เป็นพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 ซึ่งได้จากพ่อแม่ที่มีลักษณะของการผสมตัวเองไม่ติด ได้แก่ lines 441591 และ 87123 โดยพันธุ์ Chumbao ให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์ Niuxin ถึง 60 % และให้ผลผลิตเร็วกว่าถึง 3 – 5 วัน ส่วนพันธุ์ Xiyuan 4 เป็นพันธุ์ที่ต้านทานต่อ *Xanthomonas campestris* และ turnip mosaic potyvirus (Shiru *et al.* , 1995) ต่อมา Zhiyuan *et al* . (1996) ได้พัฒนาพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 ของกะหล่ำปลีจากสายพันธุ์ 8101–2–20–2 และ 8101–1–2–1 ที่มีลักษณะการผสมตัวเองไม่ติด จนได้พันธุ์ 8398 ที่มีอายุการเก็บเกี่ยวเร็วเพียง 50 วันหลังจากย้ายปลูก อีกทั้งให้ผลผลิตสูงถึง 49.5–57.0 ตัน / เฮกต้า นอกจากกะหล่ำปลีแล้ว ยังมีพืชในตระกูลกะหล่ำ (Cruciferae) อื่น ๆ อีก เช่น ผักกวางตุ้งพันธุ์ Beijing Xiao Za 60 ที่ให้ผลผลิตเร็ว ผลผลิตสูง และทนร้อน (Guang *et al* , 1996) มณีฉัตรและคณะ (2540 /2541) ได้ปรับปรุงพันธุ์ผักกาดขาวปลีจนได้พันธุ์ลูกผสมที่ดี ได้แก่ 23 × 142 และ 142 × 23 เป็นต้น

ลักษณะการผสมตัวเองไม่ติด (self - incompatibility)

หมายถึง การที่พืชผสมตัวเองตามธรรมชาติภายในดอกเดียวกัน ระหว่างดอกภายในต้นเดียวกันหรือระหว่างต้นที่มีจีโนไทป์เหมือนกันในระยะดอกบานแล้วไม่ติดเมล็ด (กมล , 2536) ทำให้พืชต้องมีการผสมข้าม ทำให้ยีนมีการจัดกลุ่ม (gene recombination) ตลอดเวลา (จานุลักษณ์, 2536)

โดยทั่วไปกลไกทางสรีรวิทยาที่เกี่ยวกับการผสมไม่ติดของพืชชั้นสูงแบ่งได้ 2 พวก คือ พวกที่ควบคุมโดย gametophyte หมายถึงการที่เกสรตัวผู้ (pollen) จะผสมติดหรือไม่ติด

จะเกิดจาก gamete เอง ส่วนอีกพวกหนึ่งเป็นพวกที่ควบคุมโดย sporophytical reaction ของต้นพ่อ (Shinohara , 1981) ซึ่งความแตกต่างระหว่าง 2 พวกนี้เป็นผลจากการที่ยีนเริ่มทำงานในช่วงเวลาที่ต่างกันในระหว่างที่เกิดเกสรตัวผู้ ในกรณีของ sporophytical control นั้นยีนจะเริ่มทำงานก่อนที่จะมีการแบ่งตัวแบบลดจำนวน (2n) ส่วนในกรณีของ gametophytical control นั้นยีนจะเริ่มทำงานหลังจากที่มีการแบ่งตัวแบบลดจำนวนโครโมโซมแล้ว (n) (Brewbaker , 1957) ในพืชตระกูลกะหล่ำ การผสมตัวเองไม่ติดเป็นแบบ sporophytic incompatibility เป็นผลจากการยับยั้งการงอกของเกสรตัวผู้บนยอดเกสรตัวเมีย (Elleman *et al.* , 1989) เพราะยอดเกสรตัวเมียซึ่งเป็นส่วนที่เป็น 2 n ได้ผลิตสารยับยั้งออกมา เกิดจากการควบคุมของยีน 1 ตำแหน่ง และหลายอัลลีล (alleles) (Bateman , 1955) ซึ่งสารยับยั้งดังกล่าวจะมีมากและทำงานได้ดีในช่วงดอกบานในช่วงดอกตูมจะไม่มีสารนี้เลย และในช่วงดอกโรยจะมีสารนี้ลดลง (Shinohara , 1981)

ลักษณะการผสมตัวเองไม่ติดแบบ sporophytic incompatibility สามารถแยกออกได้ 4 ประเภท (รูปที่ 3) (Haruta , 1962)

1.ประเภทที่ 1

จีโนไทป์มี 2 กลุ่มคือ กลุ่ม A และ C ซึ่งภายในกลุ่มเดียวกันผสมตัวเองไม่ติด และภายในกลุ่ม C ผสมข้ามระหว่างกันไม่ติด แต่สามารถผสมข้ามสลับกันต่างกลุ่มได้ติดเมล็ด กลุ่ม A มีจีโนไทป์ SaSa แต่ในกลุ่ม C มีจีโนไทป์ 2 ประเภท คือ SaSb และ SbSb ลักษณะส่วนการแสดงออกของยีนในต้นแม่และต้นพ่อ คือยีน Sb ข่มยีน Sa (Sa < Sb) อัตราส่วนของจีโนไทป์เมื่อมีการผสมติดเมล็ดเท่ากับ 67 เปอร์เซ็นต์ หรือ 4 : 6

2. ประเภทที่ 2

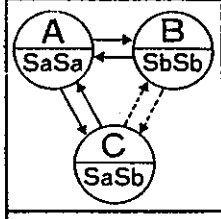
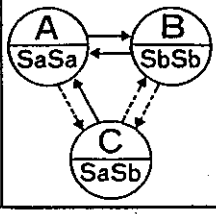
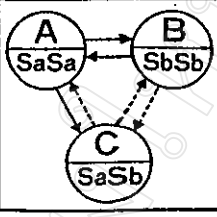
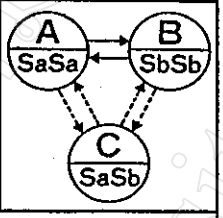
จีโนไทป์มี 3 กลุ่มคือ กลุ่ม ABC ภายในกลุ่มเดียวกันผสมกันไม่ติด การผสมข้ามกันติดระหว่างกลุ่ม A กับ B ระหว่างกลุ่ม B กับ C ผสมสลับกันไม่ติด การผสมระหว่างกลุ่ม A กับ C พบว่าผสมกันติดระหว่างกลุ่ม A ผสมกับ C (กลุ่ม A เป็นต้นแม่) การผสมระหว่างกลุ่ม C กับ A ผสมกันไม่ติด (กลุ่ม C เป็นต้นแม่) กลุ่ม A มีจีโนไทป์ SaSa กลุ่ม B มีจีโนไทป์ SbSb และ กลุ่ม C มีจีโนไทป์ SaSb ลักษณะการแสดงออกของยีนในต้นแม่คือยีน Sa และยีน Sb แสดงออกร่วมกัน (Sa = Sb) และต้นพ่อ คือ Sa < Sb อัตราส่วนของจีโนไทป์เมื่อมีการผสมข้ามกันแบบสุ่ม คือ Sa Sa : Sb Sb เท่ากับ 0.5 : 2.5 : 0 การผลิตติดเมล็ดเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ หรือ 3 : 6

3. ประเภทที่ 3

จีโนไทป์มี 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม ABC และ ผสมตัวเองภายในกลุ่มไม่ติดการผสมระหว่างกลุ่ม A และ B ผสมสลับกันติดแต่กลุ่ม B และ C ผสมสลับกันไม่ติดการผสมระหว่างกลุ่ม A กับ B ตรงกันข้ามกับประเภทที่ 2 คือ A ผสมกับ C (กลุ่ม A เป็นต้นแม่) ผสมกันไม่ติด แต่การผสมระหว่างกลุ่ม C กับ A ผสมกันติด (กลุ่ม C เป็นต้นแม่) กลุ่ม A และ B มีจีโนไทป์ SaSa และ SbSb กลุ่ม C มีจีโนไทป์ SaSb ลักษณะการแสดงออกของยีนในต้นแม่คือ Sa < Sb และในต้นพ่อคือ Sa = Sb อัตราส่วนของจีโนไทป์เมื่อมีการการผสมติดเมล็ดเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ หรือ 3 : 6

4. ประเภทที่ 4

จีโนไทป์มี 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม ABC และผสมตัวเองภายในกลุ่มไม่ติด กลุ่ม A กับ B ผสมสลับกันติด แต่กลุ่ม B และ C ผสมสลับกันไม่ติดและการผสมข้ามสลับระหว่างกลุ่ม A กับ C ไม่ติด ซึ่งตรงกันข้ามกับประเภทที่ 1 กลุ่ม A และ B มีจีโนไทป์ SaSa และ SbSb กลุ่ม C มีจีโนไทป์ SaSb ลักษณะการแสดงออกของยีนในต้นแม่และต้นพ่อคือ Sa = Sb อัตราส่วนของจีโนไทป์เมื่อผสมข้ามกันแบบสุ่มคือ Sa Sb : Sb Sb เท่ากับ 33 เปอร์เซ็นต์ หรือ 2: 6

TYPE I	II	III	IV
			
DOMINANCE RELATIONS BETWEEN ALLELES			
POLLEN:Sa< Sb	Sa< Sb	Sa : Sb	Sa : Sb
STIGMA:Sa< Sb	Sa : Sb	Sa< Sb	Sa : Sb

การแสดงออกของยีน

ต้นแม่	Sa < Sb	Sa = Sb	Sa < Sb	Sa = Sb
ต้นพ่อ	Sa < Sb	Sa < Sb	Sa = Sb	Sa = Sb

อัตราส่วนการผสมติด

	4:6	3:6	3:6	2:6
(%)	67	50	50	33

อัตราส่วนของจีโนไทป์เมื่อผสมแบบสุ่ม

	SaSa:SaSb:SbSb	SaSa:SaSb:SbSb	SaSa:SaSb:SbSb	SaSa:SaSb:SbSb
SaSa$\rightleftharpoons$SbSb	0 : 2 : 0	0 : 2 : 0	0 : 2 : 0	0 : 2 : 0
SaSa$\rightleftharpoons$SaSb	1 : 1 : 0	0.5 : 0.5 : 0	0.5 : 0.5 : 0	0 : 0 : 0
SbSb$\rightleftharpoons$SaSb	0 : 0 : 0	0 : 0 : 0	0 : 0 : 0	0 : 0 : 0
รวม	1 : 3 : 0	0.5 : 2.5 : 0	0.5 : 2.5 : 0	0 : 2 : 0

——→ = ผสมตัวเองติดเมล็ด

- - - - - - → = ผสมตัวเองไม่ติดเมล็ด

รูปที่ 3 ลักษณะประเภทของพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะการผสมตัวเองไม่ติด (Haruta , 1962)

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของลักษณะการผสมตัวเองไม่ติด

ลักษณะการผสมตัวเองไม่ติดนั้นมีความสำคัญมากต่อนักปรับปรุงพันธุ์พืช เนื่องจากนักปรับปรุงพันธุ์พืชได้ใช้ประโยชน์จากลักษณะดังกล่าวมาใช้ในการผลิตลูกผสม ในการรักษาสายพันธุ์แท้ก็นับว่าเป็นสิ่งจำเป็นเนื่องจากสภาพธรรมชาติสายพันธุ์แท้ไม่ติดเมล็ด ซึ่งการผสมตัวเองไม่ติดนอกจากจะถูกควบคุมโดยลักษณะทางพันธุ์กรรมแบบ sporophytic system แล้วยังมีปัจจัยอื่นอีกทั้งจากสภาพภายนอกและภายในของต้นพืชเอง เช่น อายุ อัตราการเจริญเติบโต อุณหภูมิ ความเข้มแสง และความแห้งของบรรยากาศ เป็นต้น

อายุดอก

การทำงานของ S–gene เกิดในระยะดอกบาน มีผลทำให้การยับยั้งการงอกของท่อละอองเกสรตัวผู้เกิดสูงสุดในระยะดอกบานดังนั้น การผลิตเมล็ดที่เกิดจากการผสมตัวเองของพืชที่ผสมตัวเองไม่ติดจึงใช้วิธีผสมตอนดอกตูม (bud pollination) (Shinohara , 1981) ซึ่งวิธีการนี้เป็นวิธีที่ใช้ในการค้าและเป็นที่ยอมรับในทางปฏิบัติว่าสามารถขยายเมล็ดพันธุ์สายพันธุ์แท้ได้ลักษณะคงที่แต่เป็นวิธีการที่เสียค่าใช้จ่ายสูง

อุณหภูมิ

การให้อุณหภูมิสูงเป็นระยะเวลาสั้น ๆ สามารถทำลายกลไกการผสมตัวเองไม่ติดได้ Alipieva (1989) รายงานว่าการให้อุณหภูมิสูง 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 2 วินาทีก่อนทำการผสมตัวเองสามารถเพิ่มการติดเมล็ดของกะหล่ำปลีได้แต่ถ้าให้อุณหภูมิสูงเป็นเวลานานจะทำให้เปอร์เซ็นต์ในการติดเมล็ดลดลง

ความชื้น

การเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ขณะทำการผสมเกสรทำให้โอกาสที่เกสรตัวผู้จะงอกมีปริมาณเพิ่มขึ้นดังนั้นโอกาสที่จะติดเมล็ดจึงเพิ่มขึ้นด้วย (Hinata , 1981)

สภาวะของก๊าซในบรรยากาศ

การให้ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์หลังการผสมเกสร 2 ชั่วโมงสามารถเพิ่มการติดเมล็ดจากการผสมตัวเองของผักกาดขาวปลีได้ (Lee , 1981)

แสง

การให้แสงเลเซอร์แก่เกสรตัวผู้เป็นเวลา 10 – 20 นาทีก่อนนำไปแตะบนยอดเกสรตัวเมีย สามารถลดการผสมตัวเองไม่ติดได้ในกะหล่ำปลี แต่อัตราการผสมติดยังไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับพันธุกรรม (Ilieva and Alipieva , 1996)

ความเค็ม

Kucera (1990) ได้ศึกษาการลบล้างลักษณะการผสมตัวเองไม่ติดในกะหล่ำดอกโดยการฉีดพ่นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 3 เปอร์เซ็นต์หลังการผสมเกสร 0.5 –1 ชั่วโมง ปรากฏว่ากะหล่ำดอกติดเมล็ดเฉลี่ย 4.3 เมล็ดต่อฝัก เมื่อเทียบกับที่ไม่พ่นซึ่งติดเมล็ดเฉลี่ยเพียง 0.4 เมล็ดต่อฝักหรือสามารถเพิ่มการติดเมล็ดได้ถึง 95 .6 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาในปี 1992 Rui *et al.* (1995) ได้ทดลองกับผักกาดขาวปลีโดยใช้ NaCl ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (6.0 , 3.0 , 1.0 , 0.5 และ 0.1 %) ที่เวลาต่าง ๆ กัน (8.30 , 9.30 , 10.00 , 14.00 และ 15.00 น.) การศึกษาดังกล่าวใช้ผึ้งช่วยในการผสมเกสร ผลปรากฏว่าที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ติดเมล็ดสูงสุด และให้ประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อพ่นเวลา 9.30 น. แต่ทุกความเข้มข้นติดเมล็ดมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ฉีดพ่น NaCl

การตรวจสอบลักษณะการผสมตัวเองไม่ติด

การตรวจสอบการผสมตัวเองไม่ติดทำได้ 2 วิธี คือ (Dickson and Wallace , 1986)

1.วิธีการตรวจหาหลอดเกสรตัวผู้ในก้านเกสรตัวเมีย (fluorescent microscope technique) เป็นวิธีที่รวดเร็ว Kho and Baer (1968) พบว่าในผนังของท่อเกสรตัวผู้ (pollen tube) เนื้อเยื่อของพืชส่วนใหญ่จะมีสาร callose ซึ่งจะไม่พบในเนื้อเยื่อของท่อเกสรตัวเมีย (style) และติดสีเฉพาะ aniline จึงต้องใช้ fluorescence ที่ฉายแสงสีฟ้า หรือ ultra violet ส่วนของ callose จะแสดงแสงสีเหลืองเขียวที่สว่างตัดกับพื้นสีดำอย่างเห็นได้ชัด

2.วิธีการตรวจนับเมล็ด (seed set analysis) เป็นวิธีที่นิยมที่สุดและได้ผลถูกต้องแน่นอน แม้ว่าต้องใช้เวลานานกว่าวิธีแรกซึ่งวิธีการนี้เป็นการเปรียบเทียบการผสมได้ระหว่างช่วงดอกบานกับดอกตูมมักทำดังต่อไปนี้ (Shinohara , 1981)

1. เลือกช่อดอกที่ดอกล่างเริ่มบานที่แต่ละช่อมีอัตราการเติบโตพอ ๆ กัน โดยไม่ใช้ลำต้นหลัก ปลิดดอกบานทิ้งคลุมดอกตูม

2. สองวันถัดมาผสมดอกบานทั้งหมด และผสมดอกตูมอีก 10 ดอก พร้อม ๆ กัน ปลิดดอกเล็กที่เหลือข้างบนทิ้ง แล้วทำเครื่องหมายรอยต่อระหว่างดอกตูมกับดอกบาน เพื่อที่จะสามารถแยกได้ตอนเก็บเกี่ยว
3. ตรวจสอบจำนวนเมล็ดในแต่ละฝักปกติมักใช้ช่อดอก 3 ช่อ เพื่อทดสอบการผสมตัวเองหลังจากตรวจสอบผลแล้วนำข้อมูลที่ได้มาคำนวนหาเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด (fertility ratio) จาก

$$\text{Fertility ratio (\%)} = \frac{\text{ผลรวมของจำนวนเมล็ดจากช่อ 3 ช่อ ที่มีฝัก 5 ฝัก ติดกันจากการผสมดอกบาน}}{\text{ผลรวมของจำนวนเมล็ดจากช่อ 3 ช่อ ที่มีผัก 5 ฝัก ติดกันจากการผสมดอกตูม}} \times 100$$

ซึ่งจะมีเกณฑ์ตัดสินดังต่อไปนี้

ผสมตัวเองติด เมื่อ อัตราส่วน มากกว่า 75 %

ผสมตัวเองไม่ติด เมื่อ อัตราส่วน น้อยกว่า 50 %

การปรับปรุงพันธุ์ผักกาดขาวปลี

การปรับปรุงพันธุ์ผักกาดขาวปลีมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้พืชที่มีลักษณะดังต่อไปนี้ คือ ให้ผลผลิตสูง และคุณภาพดี ไม่ว่าจะเป็นในเรื่องของรูปร่าง กลิ่น สี รสชาติ การต้านทานโรค เป็นต้น เช่น Minxia and Shunlian (1996) ได้ปรับปรุงพันธุ์ผักกาดขาวปลี จนได้พันธุ์ Huang Ya 14 – 1 ซึ่งพันธุ์ดังกล่าวให้ผลผลิต 37.5 – 52.5 ตัน / เฮกต้า ซึ่งมากกว่าพันธุ์ Yu Yao Huang Ya Cai ถึง 100 % นอกจากนี้ยังต้านทานต่ออากาศเย็น และ turnip mosaic potyvirus อีกด้วย ส่วนพันธุ์ Zhong bai 1. เป็นลูกผสมชั่วที่ 1 อายุการเก็บเกี่ยว 75 วัน และต้านทานต่อ *Peronospora parasitica* , *Erwinia carotovora* , *Xanthomonas campestris* , viruses และ *Alternaria brassicicola* มีลักษณะหัวสั้นใบสีเขียวอ่อนน้ำหนักหัวเฉลี่ย 4 กิโลกรัม คุณภาพหัวดี มีน้ำ 93.45 % น้ำตาล 3.13 % เส้นใย 0.68 % ascorbic acid 24.1 มิลลิกรัม /100 กรัม น้ำหนักสด ผลผลิต 90 – 120 ตัน / เฮกต้า (Wang *et al.* , 1994)

วิธีการที่ใช้ปรับปรุงพันธุ์ผักกาดขาวปลีจะใช้วิธีการที่ใช้ทั่ว ๆ ไป ของพืชผสมข้าม ได้แก่

1. การคัดเลือกหมู่ (mass selection)
2. การคัดเลือกแบบวงจรพื้นฐาน (recurrent selection)
3. พันธุ์ลูกผสม (hybrid variety)
4. พันธุ์สังเคราะห์ (synthetic variety)
5. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture)

การคัดเลือกหมู่ (mass selection) (ดำเนิน , 2541)

ในกลุ่มพืชผสมข้าม mass selection เป็นวิธีการคัดเลือกที่ใช้มาตรฐานของลักษณะภายนอก (phenotype) ของพืชแต่ละต้น (individual plant) เมล็ดของต้นที่ถูกคัดเลือกเพื่อใช้เป็นเมล็ดต้นพ่อและแม่ผสมกันเพื่อปลูกในชั่วต่อไป โดยจะนำเอาเมล็ดแต่ละต้นในจำนวนเมล็ดเท่ากันเพื่อปลูกในชั่วต่อไป วิธีการนี้จะไม่มีการควบคุมการถ่ายละอองเกสร (pollination) โดยสรุปว่าในต้นตัวเมีย (female) นั้น สามารถผสมได้กับละอองเกสรตัวผู้ (male parent gamete) ทุก ๆ ต้น ในลักษณะสุ่ม (random mating) (รูปที่ 4) เป็นวิธีการที่นักปรับปรุงพันธุ์พืชเปลี่ยนแปลงความถี่ของยีน และลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) ไปในทิศทางที่ต้องการ ซึ่งในผักกาดขาวปลีจะใช้วิธีการนี้ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ เปิด (open pollinated variety)

ข้อดีของวิธีการนี้อยู่ที่เป็นวิธีที่ง่าย สะดวกต่อการดำเนินงานและยับยั้งระดับของการถดถอยทางพันธุกรรม (inbreeding) ให้ต่ำไว้ด้วย สามารถทำได้กับประชากร (population) ใหญ่ ๆ แต่วิธีการนี้ต้องการลักษณะของ isolated field ที่ไม่มีแหล่งเกสร (pollen) อื่นเข้ามาเจือปน วิธีการนี้เป็นวิธีที่นิยมทั่วไป โดยเฉพาะการรักษาพันธุ์พืชผสมข้ามให้บริสุทธิ์อยู่เสมอ

อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ไม่เหมาะกับลักษณะที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรม (heritability) ต่ำโดยเฉพาะลักษณะที่เกี่ยวกับผลผลิต ซึ่งมักจะไม่ได้ผลแต่ใช้ได้ดีกับการคัดเลือกสายพันธุ์ที่นำเข้ามาจากแหล่งอื่น หรือการคัดเลือกเพื่อการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม หรือในสภาวะโรคและแมลง

รูปที่ 4 แผนภูมิแสดงวิธีการคัดเลือกพันธุ์หมู่ (mass selecttion) (กมล , 2536)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

การคัดเลือกแบบวงจรพื้นฐาน (recurrent selection) (กฤษฎา , 2528)

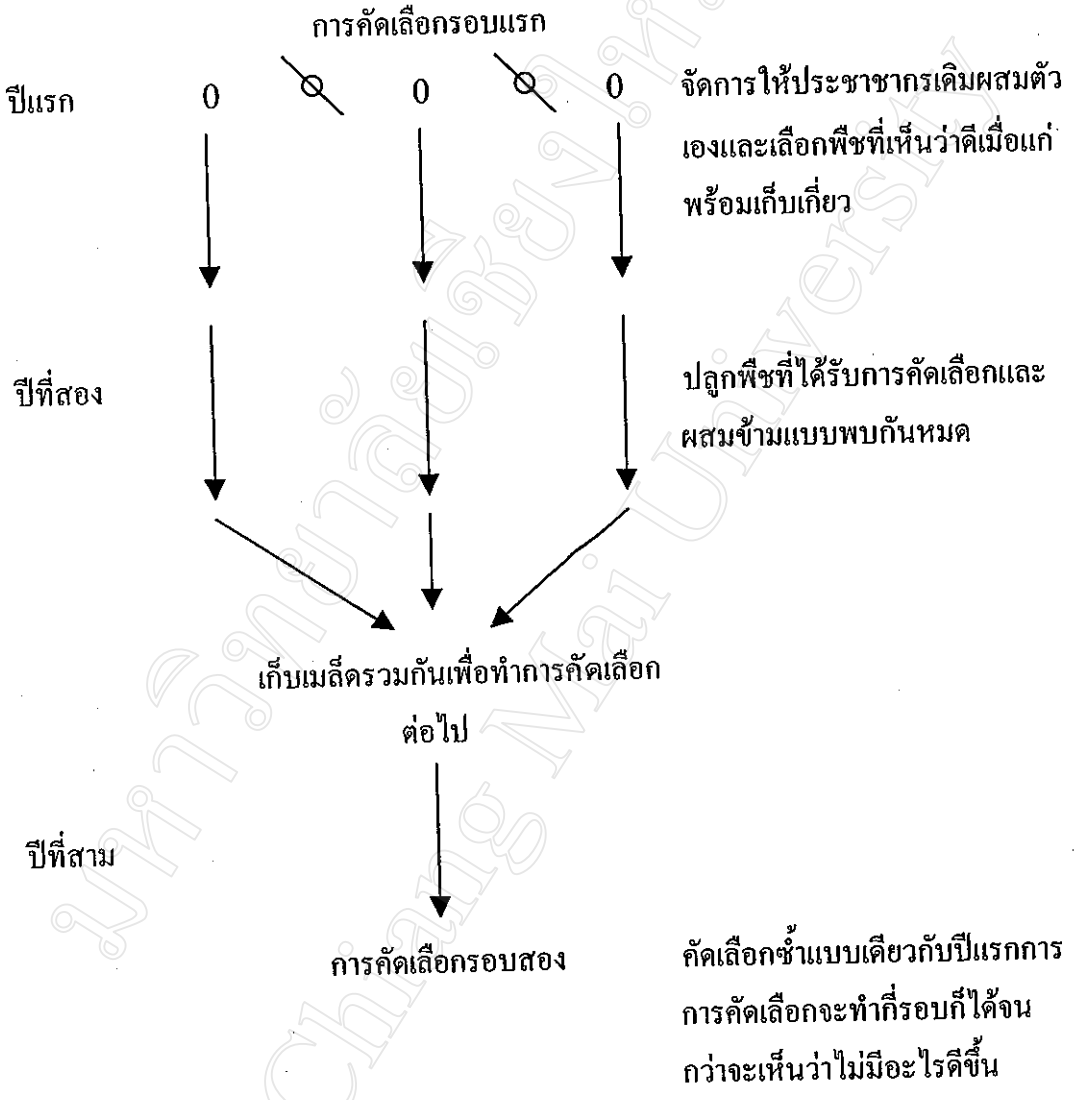
เป็นการคัดเลือกที่ดูจากลักษณะที่มองเห็นเท่านั้นไม่มีการทดสอบสมรรถนะแต่อย่างใด ดังนั้นจึงเรียกวิธีการคัดเลือกแบบนี้ว่า phenotypic recurrent selection วิธีการนี้มีข้อจำกัดอยู่กับการคัดเลือกลักษณะที่มีความสามารถในการถ่ายทอดสูงเท่านั้น ซึ่งจะเป็นลักษณะที่สามารถมองเห็นความแตกต่างได้ง่าย (รูปที่ 5) ซึ่งการคัดเลือกแบบนี้เปอร์เซ็นต์การถดถอยทางพันธุกรรม (inbreeding) จะขึ้นอยู่กับจำนวนสายพันธุ์ที่เก็บไว้และอัตราส่วนของเมล็ดจากแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งนำมารวมกันเพื่อใช้ในการคัดเลือกในรอบต่อไป

เพื่อที่จะลดเปอร์เซ็นต์การถดถอยทางพันธุกรรม ในการคัดเลือกอาจจะทำได้คือปล่อยให้เมล็ดที่ได้จากการผสมแบบพบกันหมดผสมกันอย่างอิสระครั้งหนึ่งก่อนที่จะทำการคัดเลือกในรอบต่อไปเพื่อเปิดโอกาสให้เกิดลักษณะทางพันธุกรรมที่ดี และป้องกันการเกิดการตรึงทางพันธุกรรม แต่ข้อเสียของของวิธีการดังกล่าวคือทำให้เสียเวลาในการคัดเลือกไป 1 ฤดูปลูก

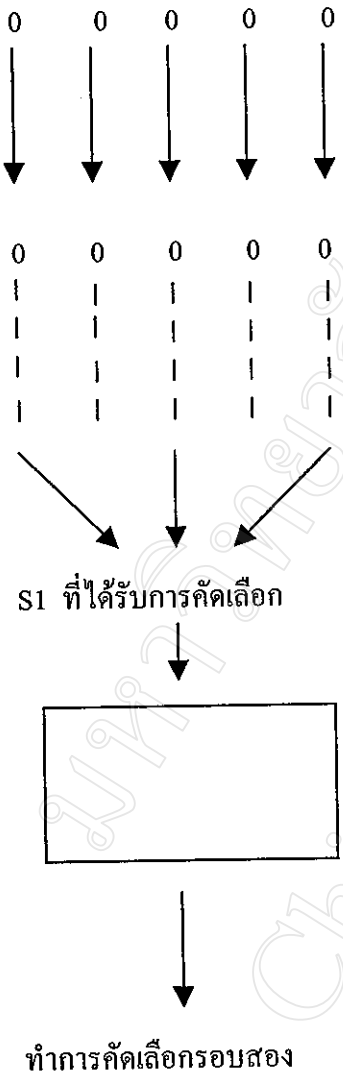
จากการที่การคัดเลือกไม่มีการทดสอบรุ่นลูกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการคัดเลือกให้ดียิ่งขึ้นควรนำเมล็ดที่ได้จากการคัดเลือกจากการทดสอบมาผสมแบบเจอกันหมด เรียกว่า วิธีการทดสอบและคัดเลือก (S1) (รูปที่ 6)

ประชากรที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์นี้แล้ว สามารถที่จะนำไปใช้ประโยชน์ได้ต่อไปนี้ (กมล , 2536)

1. เป็นแหล่งพันธุ์สำหรับสกัดสายพันธุ์แท้ (inbred line) เพื่อใช้สร้างพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1 hybrid)
2. ใช้เป็นพันธุ์พ่อ แม่สำหรับสร้างพันธุ์สังเคราะห์ (synthetic variety)
3. ใช้เป็นพันธุ์พ่อ แม่ สำหรับสร้างประชากรลูกผสม (a cultivar – cross hybrid)



รูปที่ 5 แผนภูมิแสดงการคัดเลือกแบบวงจรพื้นฐาน (recurrent selection) (กฤษฎา, 2528)



S0 จัดการผสมตัวเองประชากรเดิมและแบ่งเมล็ดที่ได้ออกเป็นสองส่วน

S1 นำเมล็ดส่วนแรกไปปลูกทดสอบผลผลิตและลักษณะอื่น ๆ

นำเมล็ดส่วนที่สองไปปลูกและผสมแบบพบกันหมด

เก็บเมล็ดรวมกันเป็นประชากรใหม่

รูปที่ 6 แผนภูมิแสดงการคัดเลือกแบบ S1 (กฤษฎา, 2528)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

พันธุ์ลูกผสม (hybrid variety)

ลูกผสม (hybrid) หมายถึง เมล็ดพันธุ์ที่ใช้ได้จากการผสมพันธุ์เพื่อให้ได้ลูกผสมในรุ่นแรก (F_1 hybrid) ทั้งนี้อาจเป็นการผสมระหว่างสายพันธุ์แท้ ตั้งแต่ 2 , 3 หรือ 4 สายพันธุ์ ลูกผสมที่ได้จะเรียกว่า ลูกผสมเดี่ยว (single cross) ลูกผสมสามทาง (threeway cross) และลูกผสมคู่ (double cross) ตามลำดับเป็นวิธีการที่นำเอาประโยชน์จากลูกผสมดีเด่น (heterosis) มาใช้อย่างมีประสิทธิภาพ (กฤษฎา , 2528) ซึ่งพันธุ์ลูกผสมเป็นพันธุ์ที่ประกอบไปด้วยประชากรพืชที่มีพันธุกรรมเป็นพันธุ์ทาง (heterozygous) แต่มีการแสดงออกของบางลักษณะหรือหลายลักษณะคล้ายคลึงกัน (homogeneity) พันธุ์ลูกผสมสามารถสร้างขึ้นมาได้ซ้ำแล้วซ้ำอีกโดยใช้พันธุ์พ่อแม่พันธุ์แท้พันธุ์เดิมทำให้มีลักษณะเหมือนเดิม (กมล , 2536)

ความดีเด่นของลูกผสม (heterosis หรือ hybrid vigor) หมายถึง ปรากฏการณ์ของลักษณะทางปริมาณ (quantitative) อันใดอันหนึ่ง เมื่อลูกผสมแสดงความสามารถเหนือกว่าความสามารถของพ่อแม่ที่แสดงออกในลักษณะดังกล่าวเมื่อปลูกในสภาพที่เปรียบเทียบกันได้(ดำเนิน , 2541)

สาเหตุของการเกิดปรากฏการนี้มี 2 ทฤษฎีคือ (กมล , 2536)

1. ทฤษฎีการข่มเกิน (overdomimance theory) เกิดจากการรวมตัวของยีนที่เป็นคู่กันมาอยู่ในสภาพพันธุ์ทางจะกระตุ้นให้กิจกรรมทางสรีรวิทยาของพืชเพิ่มขึ้นและแรงกระตุ้นนี้จะหมดไปเมื่อพืชผสมตัวเองจนเป็นพันธุ์แท้

2. ทฤษฎีการข่มปกติ (domimance theory) ในพืชผสมข้ามนั้นยีนด้อยจะถูกข่มไว้ด้วยยีนเด่น เมื่อพืชผสมตัวเองก็มีโอกาสที่จะทำให้ยีนด้อยจับคู่กันเป็นพันธุ์แท้จึงแสดงอาการเสื่อมถอยของลักษณะ เมื่อทำการผสมข้ามพันธุ์อีกครั้งหนึ่งยีนด้อยก็จะถูกข่มอีกครั้งจึงทำให้เกิดความดีเด่นขึ้น

การวัดความดีเด่นของลูกผสม (heterosis) มี 3 แบบ (ดำเนิน , 2541) คือ

1. เปรียบเทียบลูกผสมกับพ่อหรือแม่ที่แสดงลักษณะนั้น ๆ ได้มากกว่า (better parent)

$$\text{heterosis (\%)} = \frac{\overline{F}_1 - \overline{BP}}{\overline{BP}} \times 100$$

2. เปรียบเทียบลูกผสมกับค่าเฉลี่ยของพ่อแม่ (mid-parent value)

$$\text{heterosis (\%)} = \frac{\bar{F}_1 - MP}{MP} \times 100$$

3. เปรียบเทียบลูกผสมกับลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2 population) ที่มาจากพ่อแม่เดียวกัน

$$\text{heterosis (\%)} = \frac{\bar{F}_1 - \bar{F}_2}{\bar{F}_2} \times 100$$

โดยปกติแล้วมักจะเทียบระหว่างลูกผสมกับพ่อแม่ ที่แสดงลักษณะดีกว่าเพราะลูกผสมที่ไม่ดีไปกว่าพ่อหรือแม่ซึ่งเป็นพันธุ์แท้ย่อมไม่มีความหมายอะไร

วิธีการผลิตลูกผสม คือ (ดำเนิน , 2541)

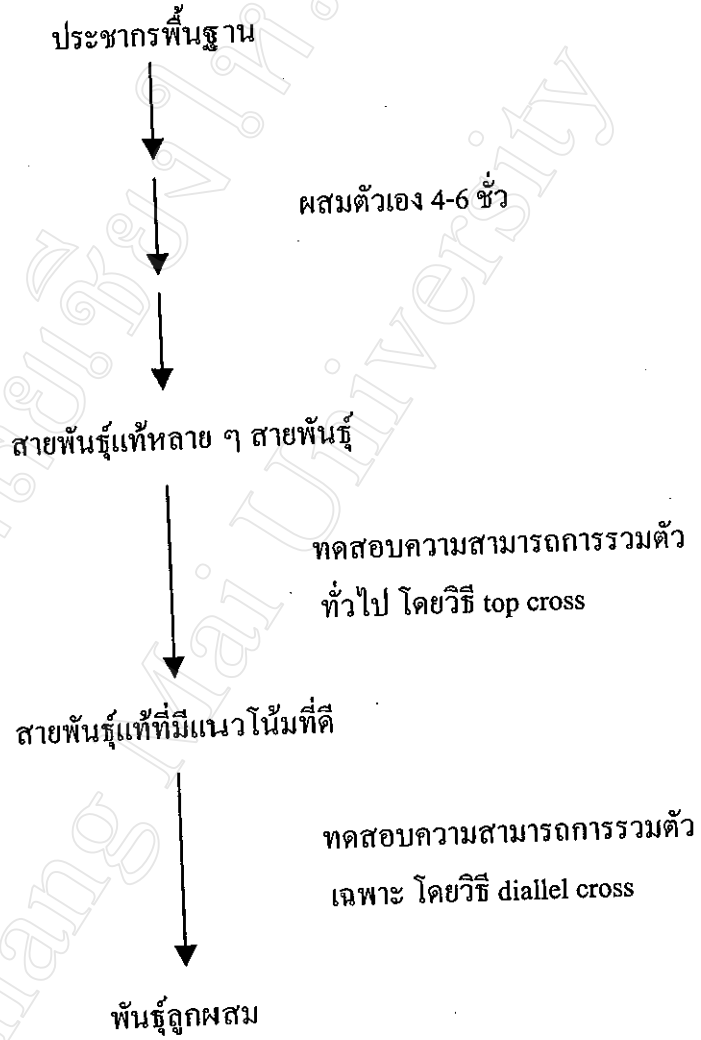
1. สร้างสายพันธุ์แท้ (fully inbred lines) จำนวนมาก ๆ

2.วิเคราะห์ความสามารถในการรวมตัวของพ่อและแม่ (combining ability) เพื่อหาสายพันธุ์ที่ดี (superior lines) ที่จะได้สร้างลูกผสม single cross หรือ double cross

3. นำเอาสายพันธุ์แท้ (inbred lines) ที่ดีเด่นมาสร้างลูกผสมเพื่อการค้า (รูปที่ 7)

ในการผลิตลูกผสมผักกาดขาวปลีจะใช้ลักษณะการผสมตัวเองไม่ติดเป็นส่วนมาก เนื่องจากผลผลิต และความแข็งแรงเป็นลักษณะปริมาณซึ่งควบคุมโดยยีนหลายกลุ่มและเป็นอิสระจากลักษณะการผสมตัวเองไม่ติด (จานุลักษณ์ , 2536) อีกทั้งยังประหยัดค่าใช่จ่ายในเรื่องแรงงานเนื่องจากไม่จำเป็นต้องทำการตอนเกสรตัวผู้ทิ้ง (emusculation)

พันธุ์ลูกผสมมีความสำคัญทั้งต่อเกษตรกรและบริษัทเมล็ดพันธุ์เนื่องจากเป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง คุณภาพดี มีความสม่ำเสมอของลักษณะต่าง ๆ หลายลักษณะได้แก่ความงอก ความแข็งแรง อายุออกดอก อายุเก็บเกี่ยว ขนาดรูปร่าง คุณภาพของผลผลิต และมีความต้านทานโรคและแมลงดีกว่าพันธุ์ผสมเปิด แต่เกษตรกรไม่สามารถเก็บเมล็ดพันธุ์ไว้ใช้เองได้เพราะจะมีการกระจายตัวของลักษณะต่าง ๆ ในลูกชั่วที่ 2 ทำให้ผลผลิตและคุณภาพลดลง 20 – 30 เปอร์เซ็นต์ (กมล , 2536) ซึ่งเป็นผลดีต่อบริษัทเมล็ดพันธุ์เพราะสามารถผลิตเมล็ดได้เรื่อย ๆ โดยใช้สายพันธุ์พ่อแม่เดิม



รูปที่ 7 ขั้นตอนการสร้างพันธุ์ลูกผสม

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

พันธุ์สังเคราะห์ (synthetic variety)

หลักการที่สำคัญในการปรับปรุงพืชผสมข้ามคือ พยายามใช้ผลประโยชน์จากการเกิดความดีเด่นของลูกผสมให้มากที่สุด ซึ่งการทำพันธุ์ลูกผสมเป็นวิธีการที่ให้ผลดีที่สุด แต่ต้นทุนในการผลิตสูงทำให้เกษตรกรต้องซื้อเมล็ดพันธุ์ในราคาแพง อีกทั้งยังไม่สามารถเก็บเมล็ดไว้ทำพันธุ์ต่อไปได้ ดังนั้นพันธุ์สังเคราะห์จึงเป็นพันธุ์ที่เหมาะสมในแง่ของการผลิตเมล็ดพันธุ์ และการใช้ประโยชน์จากความดีเด่นของลูกผสม

พันธุ์สังเคราะห์ (synthetic) หรือ พันธุ์ผสมรวม (composite) คือ ประชากรของการผสมแบบสุ่ม (random mating) ซึ่งสร้างขึ้นโดยการผสมระหว่างกลุ่มของสายพันธุ์พ่อแม่ที่คัดเลือก (selected parent lines) ในลักษณะของคู่ผสมที่เป็นไปได้ (all possible combination) จากนั้นจะต่อด้วยการปล่อยให้ประชากรนั้นผสมกันแบบสุ่มอีกอย่างน้อย 1 ชั่ว ก่อนที่จะนำไปใช้เป็นพันธุ์ส่งเสริมปลูกเพื่อการค้า (ดำเนิน , 2541)

ลักษณะโครงสร้างของพันธุ์สังเคราะห์ (synthetic variety) มีส่วนคล้ายกับโครงสร้างของพันธุ์ผสมเปิด (open pollinated variety) มาก แต่จะแตกต่างกันตรงที่ (ดำเนิน , 2541)

1. พันธุ์สังเคราะห์ (synthetic variety) พ่อแม่ที่ใช้จะมีประวัติแน่นอนและสามารถรักษา (maintain) ต่อไปได้ ดังนั้น พันธุ์สังเคราะห์ชนิดใดชนิดหนึ่งจึง สามารถสร้างใหม่ได้เรื่อย ๆ

2. เนื่องจาก synthetic variety จะถูกสร้างโดยใช้พ่อและแม่ในชั่วแรก (Syn o) จำนวนไม่มากนักซึ่งอาจทำให้เกิดปรากฏการณ์ของการถดถอยทางพันธุกรรม(inbreeding depression) ขึ้นได้บ้างในชั่วหลัง ๆ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture)

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยทั่วไปมักมีข้อจำกัดเกี่ยวกับอายุของพืชปริมาณพื้นที่ที่ใช้แรงงาน นอกจากนี้การปรับปรุงพันธุ์ยังประสบปัญหาทางเทคนิคของการคัดเลือกพืชอีกนานับประการ วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นวิธีการที่เปิดโอกาสให้นักปรับปรุงพันธุ์พืชได้ใช้เทคนิคต่าง ๆ เข้ามาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ ทำให้ข้อจำกัดบางอย่างในการปรับปรุงพืชหมดไปสะดวกและรวดเร็วกว่าที่เป็นอยู่ (กฤษฎา , 2528) เช่น การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ แล้วคัดเลือกเอาสายพันธุ์ดีไว้ ซึ่งอาจทำได้โดยการใช้สารเคมี การฉายรังสี การตัดต่อยีน (DNA recombination) และการย้ายยีน (gene transformation) หรือการผลิตพืชพันธุ์ต้านทาน (resistant plant) เราสามารถชักนำให้เกิดความต้านทานขึ้นในต้นพืชโดย

การเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเงื่อนไขต่าง ๆ เช่น การสร้างพันธุ์ต้านทานต่อสารพิษของโรค ต้านทานต่อแมลง ต้านทานต่อยากำจัดวัชพืชเป็นต้น (ประศาสตร์ , 2538)

นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้การผลิตสายพันธุ์แท้ (pure line) โดยการใช้ส่วนของเพศผู้หรือเพศเมียมาเลี้ยงเพื่อให้เจริญเป็นต้นใหม่ แต่ต้นที่ได้จะมีโครโมโซมเพียงชุดเดียว (haploid plant; n) แล้วนำต้นที่ได้มาทำการเพิ่มชุดของโครโมโซม ต้นที่ได้จะเป็น diploid (2n) ที่เป็น homozygous line ซึ่งวิธีการนี้จะใช้เวลาในสภาพธรรมชาติมากแต่ยังไม่เป็นที่นิยมในทางการค้าเนื่องจากมีค่าใช้จ่ายสูง

พิทักษ์ (2537) ทำการเพาะเลี้ยงอับเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ # 161 บนอาหารสูตร Quazi (1978) ดัดแปลงเติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 2, 4, 6, 8 และ 10 พบว่าอับเกสรสามารถพัฒนาเป็น callus ได้ในอัตราสูงสุดร้อยละ 65.37 บนอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสร้อยละ 6 และสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้ บนอาหารสูตร Quazi (1978) ที่มี GA_3 3.5 มก./ล. ร่วมกับ BAP 11.0 มก./ล. และน้ำมะพร้าวร้อยละ 10

อิเล็กโทรโฟรีซีส (electrophoresis)

อิเล็กโทรโฟรีซีส เป็นเทคนิคการแยกวิเคราะห์ สารหรือโมเลกุลที่มีประจุโดยให้สารเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าระหว่างขั้วบวกและขั้วลบ อัตราการเคลื่อนที่จะขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประจุ ซึ่งเป็นอัตราส่วนของประจุต่อน้ำหนักของสารหรือโมเลกุลนั้น ยิ่งมีความหนาแน่นของประจุสูงสารจะเคลื่อนที่ได้เร็วเทคนิคนี้สามารถใช้ได้ดีในการแยกสารทางชีวเคมี ได้แก่ กรดอะมิโน โปรตีน กรดนิวคลิอิก เป็นต้น (ดวงพร , 2538)

โดยทั่วไปการแยกจะเกิดขึ้นในสารละลายบัพเฟอร์บนสารค้ำจุนที่เป็นแผ่นหรือแท่ง (supporting medium) เพื่อช่วยลดผลกระทบจากความร้อนที่มักทำให้แถบตัวอย่างโค้ง และผลกระทบจากการแพร่ทั้งระหว่างการแยกและเมื่อสิ้นสุดแล้ว สารค้ำจุนที่นิยมใช้ในการแยกโปรตีนคือ polyacrymide gel เนื่องจากมีรูพรุนที่สม่ำเสมอ ไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นได้ง่ายตลอดจนมีความคงตัวในช่วงกว้างต่อสภาพ pH อุณหภูมิ และ ionic strength และมีเนื้อเจลใส ข้อเสียคือสารละลาย acrylamide monomer หรือผง acrylamide เป็นพิษต่อสมอง และอาจก่อมะเร็งได้

ชนิดของอิเล็กโทรโฟรีซีสที่เกี่ยวข้องกับการจำแนกสายพันธุ์พืชได้แก่ (ชวนพิศ , 2538)

1. gel electrophoresis

เป็นแบบที่มีสารตัวกลางจำพวกเจลหรือสารกึ่งแข็ง ได้แก่ แป้ง (starch) อะกาโรส (agarose) โพรีอะคริลามายด์ (polyacrylamide) การแยกของโมเลกุลสารจะอาศัยสภาพของเนื้อเจล และขนาดช่องของเนื้อเจล (pore size) ที่เตรียมให้อยู่ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน โดยทั่วไปความเข้มข้นของเจลที่ใช้อยู่ระหว่าง 2- 20 % ในอดีต gel electrophoresis ที่นำมาใช้ในงานไอโซไซม์ส่วนใหญ่จะเป็น starch gel ซึ่งเหมาะกับการศึกษาด้านกิจกรรมของเอนไซม์ แต่บางครั้งขนาดของตัวอย่างที่ต้องการศึกษาเอนไซม์มีจำกัด ทำให้ผลที่ได้ไม่ชัดเจน จึงทำให้มีการนำ polyacrylamide gel มาแทนที่เนื่องจากสามารถควบคุมขนาดของช่องเนื้อเจลได้โดยกำหนดความเข้มข้นของเจล

2. dise electrophoresis

เป็นเทคนิค zone electrophoresis ที่ใช้แยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ และจำแนกชนิดของโปรตีนที่ปะปนกันได้อย่างละเอียดทำให้ผลของแถบสีได้คมชัดที่สุด

3. isoelectric focusing หรือ electrofocusing

เป็นวิธีที่ใช้สำหรับแยกสารหรือ โมเลกุลที่มีคุณสมบัติเป็น ampholyte ได้แก่ กรดอะมิโน (amino acid) และโปรตีนซึ่งมีลักษณะเป็น dipolar ion คือมีทั้งประจุบวก และ ลบ โครงสร้างโมเลกุลขึ้นกับสภาพความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) วิธีนี้สามารถแยกโปรตีนได้ความเข้มข้นสูงได้ดีกว่าวิธีอื่น