บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

การวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินในยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้า โดยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay ต้องทำการทดลองในสภาพปลอดเชื้อซึ่งมักเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ได้เสมอ แนวทางในการปฏิบัติเพื่อให้เกิดการปนเปื้อนน้อยที่สุด ควรปฏิบัติดังนี้

1. ต้องลนไฟมีดและปากคีบทุกครั้งที่ตัดและคีบชิ้นส่วนของต้นถั่ว และเมื่อใช้มีดและปากคีบเสร็จ ให้แช่ในขวดบรรจุแอลกอฮอล์
2. เมื่อตัดส่วน hypocotyl แล้ว ให้เอาส่วนที่เหลือ(รากและใบเลี้ยง)ทิ้ง แล้วย้าย hypocotyl ที่ตัดได้ ไปอยู่ในแผ่นพลาสติกใหม่
3. ต้องเปลี่ยนแผ่นพลาสติกที่รองหั่น hypocotyl ทุกครั้ง
4. ในการตัด hypocotyl ต้องตัดทีละ 8 ชิ้น (ตัดให้พอเฉพาะใน 1 ขวด) แล้วใส่ในขวดให้เรียบร้อย ก่อน แล้วจึงตัดเพื่อใช้กับขวดใหม่
5. ก่อนใส่ hypocotyl ลงในขวดต้องลนเปลวไฟที่ปากขวดก่อน และเมื่อใส่เสร็จต้องลนเปลวไฟที่ปากขวดก่อนปิดปากขวดด้วยพลาสติก
6. ระวังอย่าให้คีมที่คีบ hypocotyl สัมผัสอาหาร
7. เมื่อทำเสร็จทุกครั้งให้นำขวดที่เสร็จแล้ว และหลอดทดลองที่ใช้เพาะถั่วออกนอกตู้ทุกครั้ง ห้ามทิ้ง ไว้ในตู้
8. ควรพ่นขวดและหลอดด้วยแอลกอฮอล์ก่อนนำเข้าตู้ Laminar air flow

ในการทำกราฟมาตราฐานต้องทำอย่างละเอียด และต้องพยายามตัดให้ขนาดของ hypocotyl มีขนาดเท่ากัน และควบคุมสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ให้เท่าเทียมกันในทุก ๆ ขวด เพื่อควบคุมความแปรปรวนของแต่ละวิธีการให้มีขนาดใกล้เคียงกัน

การหาตำแหน่ง R_f ที่มี activity ของสารคล้ายไซโตไคนินในยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้า โดยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay (SHB) พบว่า R_f ที่ 0.1 , 0.4 , 0.5 , 0.6 ,0.7 , 0.8 และ 0.9 สอดคล้อง (Fitted) กับสมการเส้นตรงที่ 2 ยกเว้น R_f ที่ 0.0 , 0.2 , 0.3 และ 1.0 ที่ไม่สอดคล้อง (Unfitted) กับสมการเส้นตรงดังกล่าว ในขณะที่โรจน์รวี (2538) ศึกษาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินในยอดลำไยพันธุ์ดอ และดรุณี (2539) ศึกษาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินในยอดลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย พบ activity ของสารคล้าย ไซโตไคนินที่ R_f 0.1 และ 0.6-0.9 ส่วน Matsui and Nakamura (1979) ศึกษาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินในยอดองุ่น พบ activity ของสารคล้ายไซโตไคนินที่ R_f 0.1, 0.4-0.5 และ 0.6-0.7 จากการศึกษาหาตำแหน่ง R_f ที่มี activity ของสารคล้ายไซโตไคนินในการทดลองที่ 1 ในบาง R_f เกิดการไม่สอดคล้องกับสมการ linear regression ของ standard curve น่าจะเป็นผลจากในตำแหน่ง R_f นั้น ๆ มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินที่ต่ำกว่า

5×10^{-5} สตล จึงทำให้ไม่สามารถคำนวณปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินออกมาได้ ดังนั้นถ้ามีผู้ใดทำการทดลองโดยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay (SHB) ควรพยายามทำ standard curve โดยใช้ kinetin เข้มข้นต่ำกว่า 5×10^{-5} สตล เพื่อที่จะสามารถคำนวณหาตำแหน่ง R_f ที่มี activity ของสารคล้ายไซโตไคนิน ได้แม่นยำยิ่งขึ้น

การศึกษาอิทธิพลของชนิด Dowex Cation Resin ที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินของยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้าในช่วงก่อนการแตกใบอ่อน 1 สัปดาห์โดยวิธี SHB โดยการหาตำแหน่ง R_f ที่มี activity ของยอดมะปราง พบว่า Dowex Cation Resin ทั้ง 3 ชนิดมีผลต่อการหาตำแหน่ง R_f ที่มี activity ของสารคล้ายไซโตไคนินในยอดมะปรางแตกต่างกัน โดย Dowex Cation Resin (grade Lab) 50WX8-100 ของ Sigma Chemical Company , MO U.S.A. จะพบ R_f ที่มี activity ที่ 0.1 , 0.4 , 0.5 , 0.6 , 0.7 , 0.8 และ 0.9 ที่สอดคล้อง (fitted) กับสมการเส้นตรงที่ 4 ส่วน Dowex Cation Resin Mix ที่ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องกรองน้ำของบริษัท ลานาลิติควอเตอร์ เวอร์ค หจก. , เชียงใหม่ ประเทศไทย ที่ทำการทุบให้ละเอียดแล้วร่อนด้วยตะแกรงขนาด 50 mesh จะพบ R_f ที่มี activity ที่ 0.3 , 0.4 , 0.5 , 0.6 , 0.7 , 0.8 และ 0.9 ที่สอดคล้อง (fitted) กับสมการเส้นตรงที่ 4 และ Dowex Cation Resin Mix ที่ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องกรองน้ำแบบไม่ทุบ ของบริษัทลานาลิติควอเตอร์ เวอร์ค หจก. , เชียงใหม่ ประเทศไทย จะพบ R_f ที่มี activity ที่ 0.2 , 0.7 , 0.8 และ 0.9 ที่สอดคล้อง (fitted) กับสมการเส้นตรงที่ 4 ซึ่งได้ตำแหน่ง R_f ที่มี activity ของสารคล้ายไซโตไคนินแตกต่างกันทั้ง ๆ ที่เก็บมาในช่วงเวลาเดียวกัน ดังนั้นควรมีตำแหน่ง R_f ที่มี activity เหมือนกัน แต่ยังมีบางตำแหน่งที่มี R_f ที่มี activity ไม่เหมือนกัน นอกจากนั้นเมื่อเปรียบเทียบถึงปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินที่สามารถสกัดได้จาก Dowex Resin ทั้ง 3 ชนิดที่ R_f 0.8 และ 0.9 พบว่า Dowex Resin ชนิด grade lab สามารถให้ปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินได้สูงที่สุด จากคุณสมบัติของ Dowex Resin ที่สามารถจับ Cation (สารคล้ายไซโตไคนิน)ได้ ซึ่ง Dowex Cation Resin ชนิด grade Lab มีความสามารถในการจับ Cation ได้ดีกว่า Dowex Cation Resin Mix ที่ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องกรองน้ำทั้งสองชนิด อาจเป็นเพราะว่าพื้นที่ผิวสัมผัสกับสารละลายตัวอย่างในการสกัดที่แตกต่างกันของ Dowex Resin ทั้ง 3 ชนิดไม่เท่ากัน และ/หรือ Dowex Resin แต่ละชนิดมีวัตถุประสงค์ในการใช้งานที่แตกต่างกัน โดย Dowex Cation Resin ชนิด grade Lab จะมีคุณสมบัติในการจับ Cation ดีกว่า Dowex Cation Resin Mix ที่ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องกรองน้ำ จึงทำให้ตำแหน่ง R_f ที่มี activity แตกต่างกัน ผลการทดลองแสดงว่าไม่สามารถใช้ Dowex Cation Resin Mix ที่ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องกรองน้ำทดแทน Dowex Cation Resin ชนิด grade Lab ได้ และการที่ได้ตำแหน่ง R_f ที่มี activity ของสารคล้ายไซโตไคนินในยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้า ใน Dowex Cation Resin Mix ที่ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องกรองน้ำแบบทุบและไม่ทุบได้ผลแตกต่างกัน เป็นเพราะว่าการทุบ Dowex Resin ไม่ได้ทำ

ให้คุณสมบัติการจับ Cation เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เพียงแต่เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกาะยึดของ Cation เท่านั้น

การศึกษาอิทธิพลของระยะเวลาในการเก็บรักษายอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้าในช่วงก่อนการแตกใบอ่อน 1 สัปดาห์ที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินโดยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay พบว่าการเก็บรักษาตัวอย่างยอดมะปรางไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมง 1 เดือน 2 เดือน และ 3 เดือนก่อนทำการวิเคราะห์ มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี LSD ซึ่งได้ผลการทดลอง สอดคล้องกับการทดลองของ สัญญา (2542) ที่ศึกษาอิทธิพลของการเก็บรักษาตัวอย่างยอดลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวยที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสก่อนนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินโดยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay ซึ่งพบว่าทุกระยะเวลา คือ 4 ชั่วโมง 1 , 2 และ 3 เดือน ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน การทดลองนี้เป็นการยืนยันอิทธิพลของระยะเวลาในการเก็บรักษาตัวอย่างยอดมะปรางไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาไว้ได้นาน 3 เดือน โดยไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินในยอดมะปราง ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายังไม่เกิดการสลายตัวของไซโตไคนิน จึงไม่ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน การทดลองนี้นับว่าเป็นการยืนยันว่าการวิเคราะห์ตัวอย่างสามารถที่จะทำการสกัดสารคล้ายไซโตไคนินจากตัวอย่างได้ในระยะเวลา 3 เดือน โดยไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินเมื่อเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

การศึกษาอิทธิพลของขนาดน้ำหนักสดที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินของยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้าในช่วงก่อนการแตกใบอ่อน 1 สัปดาห์โดยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay พบว่า ปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินเพิ่มขึ้นตามน้ำหนักสดของยอดมะปรางอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี LSD โดยการใช้น้ำหนักยอดมะปราง 30 กรัมสด จะให้ผลดีที่สุดในการหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน เพราะว่าไซโตไคนินมีการเคลื่อนที่ผ่านทางท่อน้ำ (ดนัย, 2539) การที่มีจำนวนยอดมากขึ้นทำให้มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในลิ้นจี่ (ดรุณี, 2539 ; ชัยวัฒน์, 2542 และสัญญา, 2542) ที่ได้ใช้น้ำหนักสด 30 กรัมสดในการทดลอง ดังนั้นการใช้ยอดมะปรางน้ำหนัก 30 กรัมสดจึงเหมาะสมที่สุด

การศึกษาอิทธิพลของความยาวยอดที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินของยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้าในช่วงก่อนการแตกใบอ่อน 1 สัปดาห์โดยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay พบว่าปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินเพิ่มขึ้นตามความยาวของยอดมะปรางที่ใช้อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี LSD โดยความยาว 10 เซนติเมตรจะให้ผลดีที่สุดในการหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินเพราะว่าไซโตไคนินมีการเคลื่อนที่ผ่านทางท่อน้ำ (ดนัย, 2539) การที่มีความยาวของยอดเพิ่มมากขึ้นมีผลทำให้มีท่อน้ำที่เป็นตัวลำเลียงสารไซโตไคนินเพิ่มมากขึ้นได้ จึงมีผลทำให้ปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินเพิ่มมากขึ้นได้ ซึ่งสอดคล้องกับการ

ทดลองในลิ้นจี่ (ดรุณี, 2539 ; ชัยวัฒน์, 2542 และสัญญา, 2542) ซึ่งใช้ขนาดความยาวยอดของตัวอย่างเป็น 10 เซนติเมตร ดังนั้นการใช้ยอดมะปรางขนาดความยาว 10 เซนติเมตรจึงเหมาะสมที่สุด

การศึกษาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินในยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้าก่อนการแตกใบอ่อน พบว่าปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินในสัปดาห์ที่ 4 ก่อนการแตกใบอ่อนไม่สอดคล้องกับสมการเส้นตรงที่ 18 โดยสามารถคำนวณปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินในยอดได้เมื่อสัปดาห์ที่ 3 ก่อนการแตกใบอ่อน ซึ่งปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินได้ค่อนข้างคงที่โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี LSD ในระหว่างสัปดาห์ที่ 3 , 2 และ 1 สัปดาห์ก่อนการแตกใบอ่อน หลังจากนั้นปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินจะเพิ่มขึ้นในขณะที่ต้นมะปรางแตกใบอ่อน ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ สัญญา (2542) ที่ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสารคล้ายไซโตไคนินในช่วงก่อนการแตกใบอ่อนในยอดลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย พบว่าปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินจะมีปริมาณต่ำในสัปดาห์ที่ 8 ก่อนการแตกใบอ่อน และจะคงที่ไปจนถึงสัปดาห์ที่ 4 หลังจากนั้นจะเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 และจะเพิ่มขึ้นสูงสุดในสัปดาห์ที่แตกใบอ่อน และสอดคล้องกับผลการทดลองของดรุณี (2539) ซึ่งได้มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารคล้ายไซโตไคนินในยอดลิ้นจี่ในช่วงก่อนการออกดอกและการแตกใบอ่อน พบว่าปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินจะต่ำก่อนการแตกใบอ่อน และปริมาณจะสูงขึ้นเมื่อใกล้แตกใบอ่อน และเช่นเดียวกับการทดลองของโรจน์รวี (2538) พบว่าปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินในช่วงก่อนการแตกใบอ่อนของลำไยพันธุ์ดอจะเพิ่มขึ้น ดังนั้นไซโตไคนินน่าจะมีอิทธิพลต่อการแตกใบอ่อนของยอดมะปราง

จากการทดลองครั้งนี้ พบว่าปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินในช่วง 1 - 3 สัปดาห์ก่อนการแตกใบอ่อนค่อนข้างจะคงที่โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อต้นมะปรางแตกใบอ่อนพบว่าปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินจะเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองของโรจน์รวี (2538) ที่ได้วิเคราะห์หาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินในช่วงแตกใบอ่อนของลำไยพันธุ์ดอ พบว่าในช่วง 6 – 15 วัน ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสารคล้ายไซโตไคนิน แต่ 3 วันก่อนการแตกใบอ่อนปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินก็เพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปควรมีการศึกษาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินในช่วงก่อนการแตกใบอ่อน 9 วัน , 7 วัน , 5 วัน , 3 วัน , 1 วัน และเมื่อแตกใบอ่อน เพื่อจะได้ทราบการเปลี่ยนแปลงของสารคล้ายไซโตไคนินว่าเกิดในช่วงใด

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินในช่วงก่อนการออกดอกในยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้า พบว่าปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินมีปริมาณเพิ่มขึ้นในช่วงก่อนการออกดอก โดยปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินจะมีปริมาณต่ำในสัปดาห์ที่ 8 ก่อนการออกดอก และจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในสัปดาห์ที่ 6 , 4 จนกระทั่งสัปดาห์ที่ 2 ซึ่งผลการทดลองนี้คล้ายกับผลการทดลองของชัยวัฒน์ (2542) ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินในช่วงก่อนการออกดอกในยอดลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย พบว่าปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินจะมีปริมาณต่ำในสัปดาห์ที่ 8 ก่อนการออกดอก และคงที่ไปจนถึงสัปดาห์ที่ 6 หลังจากนั้นจะเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 4 ไปจนกระทั่งถึง

สัปดาห์ที่ 2 และจะคงที่ไปจนถึงสัปดาห์ที่ออกดอก เมื่อได้เปรียบเทียบกับผลการทดลองของ Chen (1987) ที่ได้ศึกษาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินจาก xylem sap ของมะม่วง พบว่าเมื่อใบแก่จะมีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินต่ำกว่าในช่วงที่กำลังแตกใบอ่อน อย่างไรก็ตาม Chen (1991) พบว่าปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินของยอดลิ้นจี่พันธุ์ Heh Yeh จะเพิ่มขึ้นเมื่อตาใบเปลี่ยนแปลงไปเป็นตาดอก จะเห็นได้ว่าไม่ว่าจะเป็นการแตกใบอ่อนหรือออกดอกจะมีปริมาณไซโตไคนินเพิ่มขึ้น ในการทดลองนี้ก็ได้ผลสอดคล้องกันคือปริมาณไซโตไคนินในช่วงก่อนการออกดอกจะมีปริมาณไซโตไคนินมากกว่าในช่วงก่อนการแตกใบอ่อน และในการทำ microtome section นั้นยังไม่พบช่วง flower initiation ในช่วง 2 สัปดาห์ก่อนการออกดอก อาจเป็นเพราะว่ามะปรางมีช่วง flower initiation ที่รวดเร็ว คือภายในช่วงเวลาน้อยกว่า 2 สัปดาห์ก่อนการออกดอก จึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบระยะ flower initiation ของ apical meristem ได้ ดังนั้นถ้ามีการทดลองเรื่องนี้อีกในช่วง 1 สัปดาห์ก่อนการออกดอก อาจมีการเก็บยอดมาทำ microtome section ทุก 3 วัน เพื่อหาช่วง flower initiation ของมะปรางให้ได้

จากผลการทดลองนี้สามารถใช้ความรู้นี้นำมาใช้ในการทดลอง Plant Growth Regulator (PGR) ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินในยอดมะปรางเพื่อควบคุมการแตกใบอ่อนหรือการออกดอกได้ เมื่อสามารถบังคับการแตกใบอ่อนได้ก็อาจจะยับยั้งหรือกระตุ้นให้มีการแตกใบอ่อนเพื่อที่ต้นมะปรางจะสามารถสะสมอาหารในต้นได้มากพอเพียงต่อการออกดอก หรือสามารถบังคับให้มะปรางออกดอกตามความต้องการได้ แต่การศึกษาเรื่องการควบคุมการแตกใบอ่อนและการออกดอกโดยสมดุลของฮอร์โมนนั้น ยังมีฮอร์โมนอีกหลายกลุ่มที่น่าสนใจคือ จิบเบอเรลลินและเอทิลีน การศึกษาเพื่อให้ทราบถึงปริมาณและอัตราส่วนของฮอร์โมนแต่ละกลุ่มในช่วงก่อนออกดอกและแตกใบอ่อน อาจนำความรู้นี้มาใช้ควบคุมการออกดอกหรือแตกใบอ่อนได้ เหมือนใน tissue culture ที่พบสมดุลของปริมาณออกซินและไซโตไคนิน ซึ่งควบคุม differentiation ให้เกิดยอดหรือรากได้ (Wareing and Phillips, 1978)