บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 ผลของโพแทสเซียมคลอเรตและอุณหภูมิต่ำต่อการออกดอกของลำไยพันธุ์ดอ

จากการศึกษาผลของโพแทสเซียมคลอเรต และอุณหภูมิต่ำต่อการออกดอกของลำไย พบว่า โพแทสเซียมคลอเรต อัตรา 400 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ต้นลำไยออกดอกได้เร็วกว่าการปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ (17/12°C) ซึ่งสอดคล้องกับนฤเทพ (2552) ที่ราดโพแทสเซียมคลอเรตทางดินในอัตรา 12 กรัมต่อต้น สามารถชักนำให้ต้นลำไยออกดอกได้ถึง 91 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 20 วัน ขณะที่ Sringarm (2008) ได้เปรียบเทียบการชักนำให้ลำไยออกดอกด้วยโพแทสเซียมคลอเรต และได้รับอุณหภูมิต่ำ พบว่าโพแทสเซียมคลอเรตสามารถชักนำให้ลำไยออกดอกได้เช่นกัน ซึ่ง Davenport and Stern (2005) ได้รายงานไว้ว่าอุณหภูมิต่ำจะชักนำการเกิดตาดอกในลำไย ขณะที่สภาพอุณหภูมิสูงจะชักนำให้เกิดเป็นตาใบเท่านั้น

5.2 ผลของโพแทสเซียมคลอเรต และอุณหภูมิต่ำต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณไซโตไคนินในส่วนของยอด ใบ และรากลำไยพันธุ์ดอ

สำหรับการเปลี่ยนแปลงระดับไซโตไคนินในใบ ยอด และรากในช่วงก่อนการออกดอก พบว่า *t*Z/ZR มีปริมาณสูงกว่า iP/iPA ซึ่งสอดคล้องกับ Chen (1990) และ Chen *et al*. (1997) ที่พบว่าปริมาณ Z/ZR มีมากกว่า iP/iPA ในช่วงระหว่างการชักนำการเกิดดอกลำไยและลิ้นจี่ ทำนองเดียวกับนฤเทพ (2552) ที่กล่าวว่า การเปลี่ยนแปลงปริมาณฮอร์โมนไซโตไคนินในรูป iP/iPA และ *t*Z/ZR ในใบลำไยพันธุ์ดอมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วงก่อนการออกดอกเมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับสาร และ Sringarm (2008) พบว่าไซโตไคนินเป็นฮอร์โมนสำคัญในการออกดอกทั้งฮอร์โมนไซโตไคนินชนิด iP/iPA และโดยเฉพาะ *t*Z/ZR ซึ่งจะเพิ่มขึ้นมากในระยะก่อนออกดอก และระยะออกดอก หลังต้นลำไยได้รับโพแทสเซียมคลอเรต ในยอดลำไยที่ถูกชักนำให้ออกดอกด้วยอุณหภูมิต่ำ (12/17°C) ก็พบปริมาณ iP/iPA และ *t*Z/ZR มีระดับสูงขึ้น เช่นเดียวกับณัฐวดี (2545) พบปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินมีแนวโน้มสูงขึ้นในช่วงก่อนการออกดอก โดยยอดลำไยในกลุ่มที่ได้รับสารโพแทสเซียมคลอเรตมีปริมาณสารคล้ายไซโตไตนินสูงกว่ากลุ่มควบคุมในทุกสัปดาห์ที่ทำการศึกษา ดังนั้นการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนไซโตไคนินในช่วงก่อนการออกดอกสันนิษฐานเป็นเบื้องต้นว่าไซโตไคนินน่าจะมีบทบาทสำคัญในกระบวนการชักนำการออกดอกของลำไย แม้จะมีแนวโน้มในการสันนิษฐานว่า iP/iPA อาจจะไม่เกี่ยวข้องโดยตรงกับกระบวนการชักนำการออกดอกในพืชตระกูลไม้ผลชนิดต่างๆ หรือในลำไยหลังจากได้รับโพแทสเซียมคลอเรต แต่อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณไซโตไคนินชนิด *t*Z/ZR จะมีมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับปริมาณของ iP/iPA ที่สะสมอยู่ในใบแก่ด้วย เพราะเนื่องจาก iP/iPA ที่อาจถูกส่งจากรากทางท่อลำเลียงมายังใบจะเป็น precursor ของ *t*Z/ZR ก่อนที่จะเคลื่อนย้ายไปยังส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด เพื่อพัฒนาให้กลายเป็นตาดอกต่อไป (Sringarm *et al*., 2009; Potchanasin *et al*., 2009) นอกจากนี้คาดว่า NADPH จากใบอาจเป็นสื่อกลางที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนการสังเคราะห์ไซโตไคนิน ซึ่งมีความสัมพันธ์ในขั้นตอนการเปลี่ยนจาก iP/iPA ไปเป็น *t*Z/ZR โดยกระบวนการย่อยสลาย (hydroxylation) ที่บริเวณ isoprenoid side chain ของ iP/iPA ไปเป็น *t*Z/ZR ด้วยเอนไซม์ cytochrome P450 mooxygenase เป็นตัวกระตุ้นการเปลี่ยนดังกล่าว (Takei *et al*, 2001) ส่วนการกระตุ้นให้ออกดอกชักนำทางธรรมชาติโดยอุณหภูมิต่ำ พบว่าปริมาณไซโตไคนินในยอดที่เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับการเพิ่มการเคลื่อนที่ของ iP และ iPA ออกจากใบโดยทางท่อลำเลียงอาหาร ซึ่งคาดว่าเคลื่อนที่ไปสู่ยอดลำไย เพื่อส่งสัญญาณการชักนำให้ออกดอก แต่ในกรณีการชักนำให้ออกดอกด้วยโพแทสเซียมคลอเรต ซึ่งชักนำให้เกิดการออกดอกนอกฤดูยังไม่สามารถระบุได้ว่าปริมาณไซโตไคนินที่เพิ่มขึ้นในยอดมากจากแหล่งใด เนื่องจากไม่พบการเคลื่อนที่ออกจากใบของทั้ง *t*Z ZR iP และ iPA (Sringarm *et al*., 2009)

5.3 การจำแนกยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไซโตไคนินชนิด *t*Z ในลำไยภายหลังการชักนำให้ออกดอก

สำหรับการจำแนกยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไซโตไคนินชนิด *t*Z ในต้นลำไยภายหลังการชักนำให้ออกดอก โดยเลือกใช้วิธีการสกัดอาร์เอ็นเอด้วย วิธีการของกฤษณา (2553) เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นจากวิธี CTAB ให้ปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่ดี เหมาะสมสำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอของพืชในเขตร้อน และเขตกึ่งร้อน โดยอาร์เอ็นเอที่ได้สามารถนำไปสังเคราะห์ cDNA ด้วยวิธี RT-PCR และ นำไปใช้ศึกษางานด้านอื่นต่อไปได้ อาร์เอ็นเอมีข้อจำกัดด้านความเสถียร จึงเปลี่ยนให้เป็นดีเอ็นเอโดยกระบวนการ reverse transcription จากนั้นทำการศึกษาการแสดงออกของยีนโดยเทคนิค reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) เพราะเป็นวิธีที่มีความไวสูงในการตรวจหา mRNA เนื่องจากปริมาณ mRNA เป็นผลผลิตของยีนที่มีการแสดงออกในช่วงเวลา และใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เนื้อเยื่อชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น ทำให้อัตราส่วนของ mRNA บางชนิดมีอยู่สูงในเซลล์ หรือเนื้อเยื่อดังกล่าว ส่วนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนนั้นๆ จะทำให้ปริมาณของดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าของทุกๆรอบปฏิกิริยา (2n เมื่อ n เป็นจำนวนรอบของปฏิกิริยา) ทำให้สามารถตรวจหา mRNA ที่มีปริมาณเพียงเล็กน้อยได้ (มณี, 2547; สุรินทร์, 2548) แต่การตรวจสอบโดยวิธีนี้ต้องมีปัจจัย (parameter) ต่างๆที่เหมาะสม เช่น ความเข้มข้นของไพรเมอร์ ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ และจำนวนรอบของปฏิกิริยา เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ถ้ามีปริมาณน้อยเกินไปหรือไม่เหมาะสม จะไม่สามารถตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสได้ ดังนั้นการทำปฏิกิริยาที่จำนวนรอบต่างๆกันร่วมกับการตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีสจะสามารถบอกระดับการแสดงออกของยีนที่สนใจได้ (Marone *et al.,* 2001) ในการตรวจสอบผล reverse transcription อาศัยการเพิ่มปริมาณ ด้วยการทำ PCR ไพรเมอร์ที่ใช้คือ α-tubulin forward primer และ α-tubulin reverse primer แล้วนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ไปตรวจสอบผลด้วย 1.2 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่า แถบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส

เมื่อนำลำดับเบสที่ได้ไปวิเคราะห์โดยเทคนิคชีวสารสนเทศศาสตร์ โดยใช้ M13 forward primer และ M13 reverse primer มาทำ alignment เพื่อยืนยันความถูกต้องของลำดับเบสที่ได้ด้วยโปรแกรม DNAMAN พบว่ามีความเหมือนกัน (identity) สูง แล้วนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลที่ NCBI จากเวบไซต์ http://www.ncbi.nlm.nih.gov จากการวิเคราะห์ด้วยชุดโปรแกรม BLAST พิจารณาจากค่าร้อยละความเหมือน (identity) ในแต่ละเนื้อเยื่อพืช ซึ่ง Madden (2002) ได้รายงานไว้ว่า ค่าร้อยละความเหมือนสูง ลำดับเบสจะมีความเหมือนกันมากกว่าค่าร้อยละความเหมือนต่ำ จากนั้นทำ multiple alignment ด้วยโปรแกรม CLUSTAL เวอร์ชัน 2.1 เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนจำนวน 9 ตัวอย่างที่สืบค้นจากข้อมูลในฐานข้อมูลที่ NCBI

กรรมวิธีที่สามารถหาลำดับกรดอะมิโนจากไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *CYP735A2* ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของลำไย พบว่า ในชุดควบคุมซึ่งลำไยไม่ออกดอกสามารถหาลำดับกรดอะมิโนจากไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *CYP735A2* เฉพาะในรากลำไยเท่านั้น ส่วนในกรรมวิธีราดโพแทสเซียมคลอเรตสามารถหาลำดับกรดอะมิโนจากไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *CYP735A2* ได้ทั้งในยอด และรากซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่สะสมปริมาณฮอร์โมนไซโตไคนินชนิด *tZ* มากที่สุดแหล่งหนึ่งซึ่งมียีนทำหน้าที่สร้างฮอร์โมนไซโตไคนินชนิด *tZ* ซึ่งสอดคล้องจากการทดลองที่พบว่า ระดับปริมาณฮอร์โมนไซโตไคนินชนิด *tZ* มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 15 หลังการทดลอง ส่วนกรรมวิธีปลูกเลี้ยงภายใต้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อุณหภูมิต่ำ พบลำดับกรดอะมิโนจากไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *CYP735A2* ในส่วนของใบ และรากของลำไย ซึ่งแตกต่างจากกรรมวิธีที่ราดโพแทสเซียมคลอเรตที่พบในยอดลำไย ซึ่งการออกดอกของลำไยที่ราดโพแทสเซียมคลอเรต และปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำอาจมีตำแหน่งการทำงานของยีนแตกต่างกัน โดย Takei *et al*. (2004) ได้รายงานว่า *trans*-hydroxylation อาจจะมีส่วนเกี่ยวข้องในการควบคุมการเคลื่อนย้ายระยะไกลของไซโตไคนินจากรากไปยอดผ่านทาง xylem การลำเลียงนี้มีบทบาทในการส่งสัญญาณของธาตุไนโตรเจนต่อการสร้างรากพิเศษ (adventitious root) และการแตกตายอด ไซโตไคนินชนิด *tZ* เป็นไซโตไคนินที่โดดเด่นใน xylem exudates ดังนั้น *CYP735As* มีการแสดงออกมากที่สุดในราก โดยเฉพาะ *CYP735A2* จะชักนำให้เกิดรากโดยไซโตไคนิน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved