บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาอิทธิพลของหน่วยการทดลองที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนในการวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินโดยวิธี Rice Secondary Leaf Sheath Bioassay (RSLSB) ตามแบบของนพพร (2539) เพื่อช่วยประหยัดต้นกล้าข้าวและเวลาในการทดลอง เนื่องจากการทดลองที่ผ่านมาเกี่ยวกับการวิเคราะห์หาปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินยังไม่ได้มีการศึกษาขนาดของหน่วยการทดลองที่เหมาะสม โดย คณพล (2532) และ นพพร (2539) ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินในยอดมะม่วงและลำไยตามลำดับ โดยวิธี RSLSB มีขนาดหน่วยการทดลองเป็นต้นกล้าข้าว 10 ต้นต่อหนึ่งหน่วยการทดลอง ส่วน Nishijima and Katsura (1989), Nishijima *et al.* (1992), และ Nishijima *et al.* (1993) ได้ศึกษาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินโดยวิธี Rice Micro-drop Bioassay ใช้ต้นกล้าข้าว 7 ต้นต่อหนึ่งหน่วยการทดลอง การใช้ขนาดของหน่วยการทดลองที่เหมาะสมจะทำให้จำนวนซ้ำลดลง โดยที่ค่าความน่าเชื่อถือของการทดลองยังคงอยู่ในเกณฑ์ที่ผู้ทดลองต้องการ (สุรพล, 2537) จากการทดลองนี้พบว่าขนาดหน่วยการทดลองที่เหมาะสมในการทำ RSLSB คือ ต้นกล้าข้าว 8 ต้นต่อหนึ่งหน่วยการทดลองเป็นขนาดที่เหมาะสม โดยมีค่า C.V. เท่ากับ 4.706 % ซึ่งเป็นบริเวณที่กราฟมีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุด (ภาพที่ 4) โดยสุรพล (2537) กล่าวว่าการหาขนาดหน่วยการทดลองที่เหมาะสมโดยดูจากบริเวณที่เส้นกราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงมากที่สุด (point of maximum curvature) ซึ่งการหาขนาดของหน่วยการทดลองมีส่วนสำคัญอย่างมากในการลดหรือควบคุมความคลาดเคลื่อนในการทดลอง

การทำ bioassay ของจิบเบอเรลลินโดยวิธี RSLSB เป็นวิธีการที่สะดวก มีอุปกรณ์และวิธีการทำไม่ยุ่งยาก และเมล็ดข้าวเหนียวพันธุ์แพร่ 1 ก็หาได้ง่ายในประเทศไทย ดังนั้นน่าจะเป็นวิธีการทำ bioassay ของจิบเบอเรลลินที่มีประสิทธิภาพอีกวิธีหนึ่ง ซึ่งจากการทดลองพบช่วงกราฟมาตรฐานที่เป็นเส้นตรงมีตำแหน่งอยู่ระหว่างช่วง $3x10^{-9}$-$3x10^{-3}$ สตล อย่างไรก็ตามยังมีวิธีการทำ bioassay ของ จิบเบอเรลลินที่สามารถวัดความเข้มข้นของจิบเบอเรลลินได้ต่ำกว่าวิธี RSLSB เช่น วิธี Rice Micro-drop Bioassay (RMB) ของ Nishijima *et al.* (1993) ซึ่งใช้ข้าวพันธุ์ Waito-C, Tanginbozu, และ Koshihikari ซึ่งแช่เมล็ดข้าวในสารละลาย prohexadione calcium ร่วมกับ uniconazole เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสามารถวัดปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินได้ต่ำสุดถึง $3x10^{-10}$ สตล แต่ไม่ระบุช่วงที่เป็นเส้นตรง นอกจากนี้วรรณวรางค์ (2542) ใช้ข้าวพันธุ์ กข7 ในการทำ RMB วัดความเข้มข้นของ GA_3(Kyowa) ได้ต่ำถึง $3x10^{-11}$ สตล แต่เนื่องจากสารละลาย

prohexadione calcium และ uniconazole ต้องสั่งซื้อจากประเทศญี่ปุ่นในราคาที่สูง และบริษัทที่ผลิต prohexadione calcium ได้ลดความเข้มข้นของสารที่ใช้จาก 25% ไปเป็น 1% w/v ทำให้ต้องสั่งซื้อในปริมาณที่มากขึ้นเป็นการเพิ่มค่าใช้จ่ายและเป็นอุปสรรคในการวิจัย จึงน่าจะมีการศึกษาการใช้สารยับยั้งการเจริญเติบโตชนิดอื่นทดแทน เช่น paclobutrazol ซึ่งเป็นสารละลายที่หาซื้อได้ง่ายในประเทศไทยและราคาไม่สูง

การหาตำแหน่ง R_f ที่มี activity ของสารคล้ายจิบเบอเรลลินในยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้าครั้งนี้ พบ activity ของสารคล้ายจิบเบอเรลลินที่ R_f 0.3-0.8 ซึ่งได้ผลการทดลองใกล้เคียงกับการทดลองของนพพร (2539) ที่ R_f 0.4-0.8 ในลำไยพันธุ์ดอ โดยวิธี RSLSB, สุวลี (2540) ที่ R_f 0.2-0.5 ในลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวยโดยวิธี LHB, และกุลทินี (2542) ที่ R_f 0.3-0.8 ในลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวยและที่ R_f 0.3-0.8 ในมะปรางพันธุ์ทูลเกล้าโดยวิธี RSLSB (ตารางที่ 3)

วิธีการ RSLSB เป็นวิธีการที่สามารถวัดปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินที่มีความเข้มข้นต่ำได้ดีกว่าวิธี LHB จึงสามารถวัดปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินได้ในช่วงที่กว้างกว่า เนื่องจากวิธี LHB ไม่ sensitive พอจึงไม่พบ R_f 0.6-0.8 ส่วนที่พบ R_f ที่ 0.2 นั้นอาจเนื่องมาจากยอดที่นำมาทำการทดลองในแต่ละการทดลองนั้นทำในช่วงที่ต่างกัน โดยสุวลี (2540) ทำการศึกษาลิ้นจี่ในช่วงก่อนการออกดอก ส่วนกุลทินี (2542) ทำในช่วงแตกใบอ่อนซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Chen (1990) ซึ่งได้ศึกษาในลิ้นจี่พบว่าปริมาณ GA_{17} และ GA_{20} สูงมากในช่วงที่มีการแตกใบอ่อนและเติบโตทางกิ่งใบ แต่ในช่วงก่อนการออกดอกและช่วงการออกดอกไม่สามารถตรวจพบจิบเบอเรลลินทั้งสองตัวนี้ได้ ดังนั้นในการทดลองนี้เป็นการศึกษาสารคล้ายจิบเบอเรลลินในช่วงก่อนการออกดอก ซึ่งเป็นช่วงที่แตกต่างจากกุลทินี (2542) ซึ่งทำในช่วงก่อนแตกใบอ่อนจึงต้องศึกษาหาตำแหน่ง R_f ที่มี activity ของสารคล้ายจิบเบอเรลลินควบคู่ไปด้วยตามความเห็นของกุลทินี (2542) เพื่อให้ได้ช่วง R_f ที่มี activity ของสารคล้ายจิบเบอเรลลินในแต่ละช่วงที่ทำการทดลอง

การศึกษาถึงอิทธิพลของความยาวยอดที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินที่สกัดได้จากยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้าที่มีความยาวต่างกัน โดยวิธี RSLSB ซึ่งแต่ละความยาวเราใช้น้ำหนักสด 20 กรัมต่อหนึ่งตัวอย่าง พบว่าการใช้ความยาวยอด 5, 7.5, และ 10 เซนติเมตร (ใช้จำนวนยอด 60, 45, และ 30 ยอดตามลำดับ)ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากจิบเบอเรลลินถูกสร้างปริมาณมากที่ส่วนของยอด และมีการลำเลียงจากยอดไปสู่ราก (basipetal transport) ซึ่งบริเวณปลายยอดน่าจะมีปริมาณจิบเบอเรลลินมากที่สุด ซึ่งก็สอดคล้องกับการทดลองว่าที่ความยาวยอด 5 เซนติเมตรมีปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินมาก แต่จากการวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยสถิติแล้วพบว่าไม่มีความแตกต่างกับความยาวยอดที่ 7.5 และ 10

เซนติเมตร แสดงว่าการใช้ความยาวยอด 10 เซนติเมตรที่ใช้จำนวนยอด 30 ยอดต่อหนึ่งตัวอย่าง สามารถวัดปริมาณจิบเบอเรลลินที่มีประสิทธิภาพเท่ากับการใช้ความยาวยอด 5 เซนติเมตรที่ใช้จำนวนยอด 60 ยอดต่อหนึ่งตัวอย่าง ดังนั้นควรใช้ความยาวยอดมะปราง 10 เซนติเมตรในการวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลิน เนื่องจากในการเก็บตัวอย่างพบปัญหาจำนวนยอดมะปรางบนต้นมีไม่เพียงพอในการเก็บตัวอย่างไปทำการศึกษา ดังนั้นการหาความยาวยอดที่เหมาะสมจึงช่วยให้สามารถลดจำนวนยอดต่อต้นที่ทำการเก็บตัวอย่าง โดยที่ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์หาปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินยังอยู่ในเกณฑ์ที่เราต้องการ การศึกษาครั้งต่อไปอาจจะเพิ่มความยาวยอดไปเป็น 12.5 และ 15 เซนติเมตร ซึ่งหากพบว่าให้ผลไม่แตกต่างกันก็น่าจะเป็นผลดีในการลดจำนวนยอดของมะปรางที่นำมาใช้ในการศึกษา

การศึกษาถึงอิทธิพลของระยะเวลาในการเก็บรักษาตัวอย่างยอดมะปรางที่มีต่อการวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินโดยใช้วิธี RSLSB เนื่องจากในการทำการทดลองเพื่อวัดปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินจะต้องใช้ยอดจำนวนมากในการวิเคราะห์ ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ได้พร้อมกันทั้งหมดทีเดียวจึงต้องเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ซึ่งถ้าหากเกิดการสลายตัวของจิบเบอเรลลินไปมากจะทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนต่อการวิเคราะห์ปริมาณจิบเบอเรลลิน การทดลองนี้พบว่าการเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมง , 1 เดือน , 2 เดือน, และ 3 เดือน ไม่มีผลต่อปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินที่วิเคราะห์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของวรรณวรางค์ (2542) ซึ่งได้ทำการทดลองแบบเดียวกันแต่ทำกับยอดลิ้นจี่ การทดลองนี้ทำสามารถยืนยันอิทธิพลของระยะเวลาในการเก็บรักษาตัวอย่างพืชโดยใช้พืชต่างชนิดกันกับการทดลองที่มีผู้ทำมาก่อนหน้าแล้ว อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองในตารางที่ 8 พบว่าปริมาณจิบเบอเรลลินมีแนวโน้มลดลง ดังนั้นหากต้องการที่จะเก็บรักษายอดไว้นานกว่า 3 เดือนควรมีการทำการทดลองเพื่อยืนยันอีกครั้ง

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินในยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้าก่อนการออกดอก พบว่าปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินมีปริมาณสูงในสัปดาห์ที่ 8 ก่อนการออกดอก และปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินลดลงเรื่อยๆในสัปดาห์ที่ 6 , 4 จนกระทั่งสัปดาห์ที่ 2 ก่อนการออกดอก ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของนพพร (2539) ซึ่งได้พบการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารคล้ายจิบเบอเรลลินในยอดลำไยพันธุ์ดอพบว่ามีสารคล้ายจิบเบอเรลลินมีปริมาณสูงในสัปดาห์ที่ 6 ก่อนการออกดอก และคงที่ไปจนถึงสัปดาห์ที่ 3 ก่อนการออกดอก จากนั้นปริมาณลดลงต่ำสุดในสัปดาห์ที่มีการออกดอก นอกจากนี้สุวลี (2540) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินในยอดลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวยก่อนการออกดอกโดยวิธี LHB พบว่ามีปริมาณสารคล้าย

จิบเบอเรลลินมากในสัปดาห์ที่ 4 ก่อนการแทงช่อดอก แล้วปริมาณลดลงในสัปดาห์ที่ 3 และคงที่ไปจนถึงสัปดาห์ที่ 2 ในขณะที่ปริมาณจะลดลงอีกครั้งจนไม่สามารถวัดได้ในสัปดาห์ที่ 1 และ 0 ส่วนวรรณวรางค์ (2542)ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารคล้ายจิบเบอเรลลินในยอดลิ้นจี่เช่นเดียวกันแต่ใช้วิธี RMB พบว่าสารคล้ายจิบเบอเรลลินมีปริมาณสูงในสัปดาห์ที่ 4 และ 3 ก่อนการออกดอก และมีปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินลดลงในสัปดาห์ที่ 2 ซึ่งเป็นสัปดาห์ที่เริ่มเกิดการสร้างตาดอก หลังจากนั้นปริมาณจะลดลงต่อไปอีกในสัปดาห์ที่ 1 ก่อนการออกดอกจนถึงสัปดาห์ที่ออกดอก (มองเห็นด้วยตาเปล่า) ส่วนการศึกษาของ Chen (1990) พบว่าปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินเริ่มลดลงตามลำดับตั้งแต่ช่วงการพักตัวของตา ช่วง 30 วันก่อนการสร้างตาดอก ช่วงการสร้างตาดอก และช่วงดอกบาน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในยอดมะม่วงที่ Chen (1987) ได้ศึกษาไว้พบว่าปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินในระยะที่เกิดตาดอกและช่วงที่ดอกบานเต็มที่อยู่ในระดับต่ำ คณพล (2532) พบว่าปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินในมะม่วงพันธุ์เขียวเสวยในช่วงการออกดอกมีปริมาณลดลงไม่สามารถตรวจพบได้หลังจากสัปดาห์ที่ 6 ก่อนการออกดอกจนถึงระยะที่ออกดอก

และจากการทำ microtome section ในการศึกษาครั้งนี้ เริ่มเห็นการเปลี่ยนแปลงของ apical meristem แล้วในสัปดาห์ที่ 4 โดยที่ apical meristem มีการยุบตัวลง และในสัปดาห์ที่ 2 เริ่มเห็นการแบ่งตัวเพื่อสร้างตาดอกได้ชัดเจนขึ้น ซึ่งลักษณะคล้ายกับการเปลี่ยนแปลงในยอดลิ้นจี่ของวรรณวรางค์ (2542) ที่เริ่มเกิดการสร้างตาดอก ในสัปดาห์ที่ 2 ก่อนการออกดอก แต่ยังไม่พบช่วงการสร้างตาดอก เนื่องจาก apical meristem ยังไม่เกิดการเปลี่ยงแปลงโครงสร้าง (Esau, 1965) อาจเป็นเพราะว่ามะปรางมีช่วงการสร้างตาดอกที่รวดเร็ว คือ ภายในช่วงเวลาน้อยกว่า 2 สัปดาห์ก่อนการออกดอก จึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบระยะการสร้างตาดอกของ apical meristem ได้ ดังนั้นหากมีการศึกษาในเรื่องนี้อีกในช่วง 2 สัปดาห์ก่อนการออกดอกควรมีการเก็บยอดมะปรางมาทำ microtome section ทุกวันเพื่อหาช่วง การสร้างตาดอกของมะปราง