การเปลี่ยนแปลงปริมาณฮอร์โมนในช่วงก่อนการออกดอกนอกฤดูของลำไยและลิ้นจี่ ได้เริ่มทำการวิจัยมาตั้งแต่ปีพ.ศ. 2550 ถึงปี พ.ศ. 2552 โดยได้รับการถ่ายทอดเทคโนโลยีในการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืชด้วยวิธีเรดิโออิมมูโนเอสเส (Radioimmunoassay) จากมหาวิทยาลัยโฮเฮนไฮม์ ประเทศเยอรมนี รวมถึงการสนับสนุนอุปกรณ์บางส่วน ดังนั้นในปีแรกจึงได้เริ่มพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนพืชด้วยวิธีดังกล่าว ซึ่งทำให้สามารถจัดตั้งหน่วยวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืชขึ้นที่คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และสามารถจัดอบรมถ่ายทอดเทคโนโลยีการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืชจำนวน 2 ครั้ง นอกจากนี้ยังสามารถผลิตแอนติเจน IAA-BSA, Z/ZR-BSA, iP/iPA-BSA และ GA_3-BSA ในรูปของผลึกสีขาว ซึ่งสามารถใช้กระตุ้นให้กระต่ายพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี (Polyclonal anitobody) จับกับแอนติเจนดังกล่าวได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์ binding อยู่ระหว่าง 30-60 % ซึ่งโพลีโคลนอล-แอนติบอดีจากกระต่ายทดลอง สามารถนำไปใช้ในวิธีการตรวจวัดฮอร์โมนชนิดต่างๆ ด้วยวิธี Radioimmunoassay (RIA) หลังจากนั้นในปีที่ 2 และปีที่ 3 ได้เริ่มพัฒนากระบวนการเก็บตัวอย่างพืช การทำให้บริสุทธิ์ และทดสอบความสามารถของโพลีโคลนอลแอนติบอดีในการจับกับฮอร์โมนที่สกัดจากเนื้อเยื่อพืช รวมถึงพัฒนากราฟมาตรฐานของฮอร์โมนพืชแต่ละชนิดเพื่อใช้ในการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนพืช ในลำไยและลิ้นจี่ นอกจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณฮอร์โมน ยังมีศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณคาร์โบไฮเดรต ไนโตรเจน และกิจกรรมของเอนไซม์ไนเตรทรีดักเตส ในช่วงก่อนการออกดอก โดยชักนำการออกดอกในลำไยด้วยการใช้สารโพแทสเซียมคลอเรต การควั่นกิ่ง และการให้อุณหภูมิต่ำในลิ้นจี่

ผลการทดลองโดยรวมสามารถสรุปได้ดังนี้ การทดลองในลำไยพบว่า หลังการให้สารโพแทสเซียม-คลอเรตทั้งในสภาพแปลงปลูก และการปลูกในกระถาง สามารถชักนำให้เกิดตาดอกได้หลังจากราดสารแล้ว 21 วัน และต้นลำไยมีการออกดอก 100% ในขณะที่ไม่พบการออกดอกในต้นที่ไม่ได้ราดสาร เมื่อเก็บตัวอย่างยอดมาวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนในช่วงก่อนการออกดอกพบว่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณฮอร์โมนไซโตไคนินในยอดเพิ่มขึ้น 2-3 เท่า และพบปริมาณไซโตไคนินเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งออกดอกเมื่อเทียบกับต้นลำไยที่ไม่ได้ราดสาร เช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงปริมาณออกซินที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วงก่อนการออกดอกในขณะที่ปริมาณค่อนข้างคงที่ในต้นที่ไม่ได้ราดสาร ส่วนปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก มีปริมาณค่อนข้างคงที่ตลอดช่วงทดลองและไม่มีความแตกต่างกันระหว่างต้นที่ราดสารและไม่ราดสาร นอกจากนี้พบว่าปริมาณคาร์โบไฮเดรต (TNC) ในใบลดลงตลอดช่วงการทดลองในทั้งสองกรรมวิธี และการราดสารโพแทสเซียม-คลอเรตทำให้ปริมาณ TNC ในใบต่ำกว่าการไม่ราดสารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการลดลงของปริมาณกิจกรรมไนเตรทรีดักเตสในใบหลังการให้สารโพแทสเซียมคลอเรต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบการปลูกแบบไฮโดรโปนิกส์ ส่วนปริมาณไนโตรเจนในใบไม่มีความแตกต่างกัน และมีปริมาณค่อนข้างคงที่ตลอดช่วงทดลอง

ส่วนการทดลองในห้องควบคุมอุณหภูมิพบว่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณไซโตไคนิน (iPA) ในใบลำไยเพิ่มขึ้นในวันที่ 10-20 หลังได้รับอุณหภูมิต่ำ เช่นเดียวกับในตายอดปริมาณ iPA เพิ่มขึ้นในวันที่ 5 และ 15 หลังได้รับอุณหภูมิต่ำ ส่วนในรากปริมาณมีแนวโน้มลดลงเรื่อย ๆ หลังได้รับอุณหภูมิต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม และการราดสารโพแทสเซียมคลอเรต ซึ่งการราดสารโพแทสเซียมคลอเรตทำให้ปริมาณ iPA ในตายอดเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในวันที่ 15-30 หลังการราดสาร จากผลการทดลองข้างต้นอาจสรุปได้ว่าสารโพแทสเซียมคลอเรตมีผลต่อการลดลงของปริมาณกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรทรีดักเตส และปริมาณ TNC นอกจากนี้ยังมีผลต่อสมดุลของฮอร์โมนไซโตไคนินและออกซิน โดยพบว่า CK/IAA สูงจะกระตุ้นการออกดอก ในขณะที่ CK/IAA ต่ำ จะไม่มีการออกดอก ซึ่งสมดุลของฮอร์โมนดังกล่าวน่าจะเป็นปัจจัยสำคัญในกลไกการออกดอกของลำไย

สำหรับการทดลองในลิ้นจี่ ได้ทำการทดลองควั่นกิ่งในเดือนเมษายน เพื่อกระตุ้นการออกดอกในต้นลิ้นจี่ที่ปลูกที่ระดับความสูง 750 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล (msl) และในเดือนตุลาคม ที่ 1200 msl ผลการทดลองพบว่าที่ระดับ 750 msl ต้นลิ้นจี่มีการแตกใบอ่อน และออกดอกในลักษณะช่อดอกปนใบอ่อน โดยมีเปอร์เซ็นต์การออกดอกประมาณ 21% ในทั้งสองกรรมวิธี (ควั่นกิ่ง และไม่ควั่นกิ่ง) การควั่นกิ่งมีแนวโน้มทำให้การสังเคราะห์แสง ประสิทธิภาพของคลอโรฟิลล์ลดลงในช่วงออกดอก เมื่อวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนในยอดในช่วงก่อนการออกดอกพบว่าสอดคล้องกับการทดลองในลำไย กล่าวคือ การเปลี่ยนแปลงปริมาณฮอร์โมนไซโตไคนินในยอดเพิ่มขึ้นในช่วงก่อนการออกดอกทั้งต้นที่ควั่นกิ่งและไม่ควั่นกิ่ง ส่วนการเปลี่ยนแปลงปริมาณออกซิน พบว่าการควั่นกิ่งมีแนวโน้มทำให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นในช่วงก่อนการออกดอกในขณะที่ปริมาณค่อนข้างคงที่ในต้นที่ไม่ได้ควั่นกิ่ง ส่วนปริมาณ TNC ในใบไม่แตกต่างกันในทั้งสองกรรมวิธี และมีปริมาณค่อนข้างคงที่ในช่วงก่อนการออกดอก และปริมาณจะลดลงเล็กน้อยในช่วงหลังการออกดอก อย่างไรก็ตามพบว่าการควั่นกิ่งมีแนวโน้มทำให้ปริมาณ TNC ในเนื้อไม้สูงขึ้น ส่วนปริมาณไนโตรเจนในใบไม่มีความแตกต่างกัน และมีแนวโน้มลดลงในช่วงก่อนการออกดอก ซึ่งมีค่าประมาณ 1.5%

สำหรับการทดลองที่ระดับความสูง 1200 msl ในปี 2550 พบว่าการควั่นกิ่งทำให้มีการออกดอก 22% ในขณะที่ต้นที่ไม่ได้ควั่นกิ่งมีเปอร์เซ็นต์การออกดอกเพียง 8% เมื่อเก็บตัวอย่างยอดมาวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพบว่าปริมาณไซโตไคนิน (Z/ZR) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วงก่อนการออกดอกในต้นที่ไม่ได้ควั่นกิ่ง ในขณะที่ต้นที่ควั่นกิ่งปริมาณค่อนข้างคงที่ ส่วนปริมาณออกซินมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วงก่อนการออกดอกทั้งสองกรรมวิธี เมื่อพิจารณา CK/IAAในยอดพบว่ามีค่าค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับการทดลองในลำไย นอกจากนี้พบว่าปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกในยอดมีแนวโน้มลดลงหลังการควั่นกิ่ง เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ควั่นกิ่ง ในขณะที่การทดลองในปี 2551 ที่ระดับความสูง 1200 msl พบว่าการควั่นกิ่งสามารถยับยั้งการแตกใบอ่อนในช่วงก่อนการออกดอกได้และทำให้มีเปอร์เซ็นต์การออกดอกประมาณ 90% ในขณะที่ไม่พบการออกดอกในต้นที่ไม่ควั่นกิ่ง การควั่นกิ่งทำให้อัตราการสังเคราะห์แสงและประสิทธิภาพคลอโรฟิลล์ลดลงในช่วงก่อนการออกดอก เมื่อเก็บตัวอย่างยอดมาวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนในช่วงก่อนการออกดอกพบว่า การเปลี่ยนแปลงปริมาณไซโตไคนิน (Z/ZR) ทั้งสองกรรมวิธีมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วง 4 สัปดาห์ และดูเหมือนว่าการควั่นกิ่งทำ

ให้ปริมาณไซโตไคนินในยอดเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการไม่ควั่นกิ่ง ส่วนปริมาณออกซินมีแนวโน้มลดลงในช่วงก่อนการออกดอกในทั้งสองกรรมวิธี และมีปริมาณไม่แตกต่างกัน ซึ่งพบว่า CK/IAA ในยอดมีค่าค่อนข้างต่ำเช่นเดียวกัน นอกจากนี้พบว่าการควั่นกิ่งทำให้มีปริมาณ TNC ในใบเพิ่มขึ้นในช่วง 2 สัปดาห์ก่อนก่อนการออกดอก และพบการสะสม TNC ในเนื้อไม้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตลอดช่วงการทดลอง

จากผลการทดลองดังกล่าวอาจสรุปโดยรวมได้ว่าฮอร์โมนที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมออกดอกในลำไย คือฮอร์โมนไซโตไคนิน (Z/ZR) และฮอร์โมนออกซิน (IAA) อัตราส่วน CK/IAA สูง น่าจะเป็นตัวชักนำการออกดอกในลำไย สำหรับลิ้นจี่ในการทดลองนี้การควั่นกิ่งยังไม่สามารถควบคุมการออกดอกให้แน่นอนและสม่ำเสมอได้จึงไม่สามารถบอกความแตกต่างของการเปลี่ยนแปลงปริมาณฮอร์โมนได้ชัดเจนเหมือนกับการใช้โพแทสเซียมคลอเรตในลำไย และการศึกษาในสภาพแปลงปลูกไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิต่ำที่มีผลต่อการออกดอกได้ ดังนั้นการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการที่มีการควบคุมสภาพแวดล้อม น่าจะทำให้ได้ผลการวิจัยที่ชัดเจนขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาต่อไปในเรื่องอัตราส่วน CK/IAA สูง ในยอดที่น่าจะสามารถอธิบายกลไกในการออกดอกในไม้ผลได้ชัดเจนมากขึ้น นอกจากนี้การศึกษาเชิงลึกของความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงฮอร์โมนภายในพืชกับยีนที่ควบคุมการออกดอกในไม้ผลก็เป็นเรื่องที่น่าสนใจศึกษาต่อไป

Changes in hormonal contents prior to off season flowering of longan and lychee were carried out since 2007-2009 by using radioimmunoassay technique which transferred from The University of Hohenheim, Germany and supported some equipments. Therefore, in the first year, Radioimmunoassay (RIA) technique was started to develop at the Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, where plant hormone analysis unit was established. Plant hormone analysis transferred technology workshops were done for 2 times. Furthermore, IAA-BSA, Z/ZR-BSA, iP/iPa-BSA and GA_3-BSA antigens could be produced in form of white crystal which using to immunize ' New Zealand White' rabbits to produce polyclonal antibodies. The percentage of binding between antigen and antibody was 30-60%. The polyclonal antibodies from the rabbits were utilized in plant hormone detection by RIA. In the second and third year, procedures of plant hormones analysis from plant tissues were developed. Besides studying on changes in hormonal contents, the changes in contents of carbohydrate, nitrogen and nitrate reductase enzyme activity prior to off season flowering were also investigated. Flower induction treatments were application of potassium chlorate ($KClO_3$), girdling and low temperature.

The general results were concluded that in the longan experiment; longan trees both in field and pot flowered 100% at 21 days after $KClO_3$ application, while there was no flowering in non treated trees. After sampling shoot apex and analyzed plant hormones, it was found that $KClO_3$ increased cytokinin content in shoot 2-3 folds and increasing further until flowering as compared to non treated trees. The same as auxin content which tended to increase prior to flowering, while it seemed unaltered in non treated tree. Although gibberellic acid contents were consistent throughout experimental period and they were not different in both treatments. Furthermore, it was found that TNC content in leaves decreased throughout experimental period in both treatments. Interestingly, the TNC content in leaves of treated trees was significant lower than another. Reducing in TNC corresponded with reducing in NR activity in leaves after $KClO_3$ application, especially in hydroponics planting system. However, the nitrogen contents in leaves were unaltered and not different in both treatments. In the last experiment, low temperature seemed to increase iPA concentration in leaf and apical bud, but did not in root as compared to control and $KClO_3$ treatments. Interestingly, the iPA concentration distinguish increased after $KClO_3$ treatments. It could be concluded that application of potassium chlorate by soil drench affected on reducing in NR activity and TNC content in leaves. Interestingly after potassium

chlorate application high CK/IAA in shoot was found prior to flowering, while low CK/IAA was found in shoot of non flowering trees. Hormonal balance of CK/IAA should be crucial factor of floral mechanism in longan.

In the lychee experiment; girdling was done in April for promote flowering in lychee grown at 750 meter above mean sea level (msl) and in October at 1,200 msl. The results reveal that at 750 msl the lychee trees had leaf flushing and flowering. The flower panicle consisted of young leaves. The percentage of flowering was 21% both in girdling and non girdling treatments. Girdling seemed to reduce photosynthesis rate and chlorophyll efficiency. Changes in hormonal contents in apical shoots were corresponded with in longan experiment which the changes in cytokinins in the apical shoots were increased in both treatments. Girdling seemed to increase IAA content in shoot prior to flowering but did not in non girdling treatment. Furthermore, it was found that TNC contents in leaves were not different in both treatments. The contents were quite stable prior to flowering and slightly declined after flowering, however the TNC content in wood seemed to increase after girdling. There were no differences on nitrogen content in leaves prior to flowering. The nitrogen contents in leaves were about 1.5%.

The lychee experiment at 1,200 msl in 2007 revealed that percentage of flowering was 22% and 8% in girdled and non girdled trees. After sampling shoot apex and analyzed plant hormones, it was found that changes in Z/ZR tended to increase prior to flowering in non girdled trees while they were stable in girdled trees. Furthermore, the changes in IAA tended to increase prior to flowering in both treatments. Low CK/IAA was found when compared to longan experiment. In addition the changes in GAs in shoot tended to decrease after girdling as compared to non girdled treatment, while the results at 1200 msl in year 2008 revealed that girdling on lychee tree could inhibit leaf flushing prior to flowering and promoted 90% flowering, while 0% was found in non girdled trees. Girdling seemed to reduce photosynthesis rate and chlorophyll efficiency. However, there was not so clear about changes in hormonal contents in shoots and leaves. It was found that the changes in Z/ZR tended to increase during 4 weeks in both treatments and girdling seemed to increase Z/ZR in shoot as compared to non girdled trees. In contrast, the changes in IAA tended to decrease prior to flowering in both treatments and there was no difference between treatments. Low CK/IAA was also found. Interestingly TNC in leaves increased during 2 weeks before flowering and TNC accumulation was distinguish found in wood throughout experimental period.

According to the results above, it could be concluded that cytokinin (Z/ZR) and auxin (IAA) play crucial role to control flowering in longan. High CK/IAA may induce flowering in longan. However, girdling in lychee trees could not control regular flowering as potassium chlorate did in longan. So the changes in hormonal content prior to flowering in lychee were still blurry. Low temperature is still a main factor for inducing flower bud in lychee but it is not possible to control low temperature in filed experiment. Therefore, studying in laboratory scale should get results obviously. Especially studying in high CK/IAA in shoot may explain more distinctly in flowering mechanism. Furthermore, studying deeply in the relationship between hormonal changes and flowering genes in fruit trees should be interesting.