



ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *Phenylalanine ammonia lyase*  
(*PAL*) และสารประกอบฟีนอลิกต่อความสามารถในการเข้ากันได้ของต้นตอ  
และกิ่งพันธุ์ยางพาราต่างๆ

The Relationship between *PAL* Gene Expression and Phenolic Compounds in  
Compatibility of Different Rubber Rootstock-Scion

พรทิพย์ แสงศิลป์  
Porntip Sangsil

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of  
Master of Science in Plant Science  
Prince of Songkla University  
2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *Phenylalanine ammonia lyase*  
(*PAL*) และสารประกอบฟีนอลิกต่อความสามารถในการเข้ากันได้ของต้นตอ  
และกิ่งพันธุ์ยางพาราต่างๆ

The Relationship between *PAL* Gene Expression and Phenolic Compounds in  
Compatibility of Different Rubber Rootstock-Scion

พรทิพย์ แสงศิลป์  
Porntip Sangsil

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of  
Master of Science in Plant Science  
Prince of Songkla University  
2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์	ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน <i>Phenylalanine ammonia lyase (PAL)</i> และสารประกอบฟีนอลิกต่อความสามารถในการเข้ากันได้ของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ยางพาราต่างๆ
ผู้เขียน	นางสาวพรทิพย์ แสงศิลป์
สาขาวิชา	พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	คณะกรรมการสอบ
..... (ดร. กรกช นาคคนอง)	.....ประธานกรรมการ (ดร. เสาวภา ต้ววงปาน)
.....	.....กรรมการ (ดร. กรกช นาคคนอง)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	.....กรรมการ
..... (รองศาสตราจารย์ ดร. จรัสศรี นวลศรี)	.....กรรมการ (รองศาสตราจารย์ ดร. จรัสศรี นวลศรี)
.....	.....กรรมการ (ดร. ธีญญ์วนิช ธีญญ์วิวรรธน์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้  
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร. วีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ดร. กรกช นาคคนอง)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นางสาวพรทิพย์ แสงศิลป์)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน  
และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวพรทิพย์ แสงศิลป์)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน <i>Phenylalanine ammonia lyase (PAL)</i> และสารประกอบฟีนอลิกต่อความสามารถในการเข้ากันได้ของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ยางพาราต่างๆ
ผู้เขียน	นางสาวพรทิพย์ แสงศิลป์
สาขาวิชา	พืชศาสตร์
ปีการศึกษา	2558

### บทคัดย่อ

ยีน *Phenylalanine ammonia lyase (PAL)* เป็นยีนที่สำคัญในวิถีของ phenylpropanoid ที่ควบคุมการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก ซึ่งเกี่ยวข้องกับ การตอบสนองต่อสภาวะเครียดต่างๆ รวมไปถึง ปฏิสัมพันธ์ระหว่างต้นตอ/ กิ่งพันธุ์ดีของพืช งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนยีน *PAL* และศึกษา ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *PAL* ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก การเจริญเติบโต และการ พัฒนาของกิ่งพันธุ์ยางพาราที่เกิดขึ้นหลังจากการติดตาระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีต่างๆ ผลการโคลนยีน *PAL* จาก cDNA ของยางพารา พบว่ายีน *PAL* มีขนาด 2,145 คู่เบส และแปลรหัสให้โปรตีนที่มีขนาด 721 กรดอะมิโน จากการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน พบว่า ลำดับกรดอะมิโน *PAL* ใน ยางพารามีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนในพืชอื่นๆ มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการแสดงออกของยีน *HbPAL* ในต้นตอพันธุ์พื้นเมืองกับกิ่งพันธุ์ดี RRIM 600 และ RRIT 251 หลังจากการติดตา 7, 14, 21 และ 28 วัน มีการแสดงออกของยีน *PAL* ที่สูงในวันที่ 7 หลังจากการติดตา โดยในกิ่งตอพันธุ์ดีพันธุ์ RRIM 600 ที่ทำ การติดตากับต้นตอพันธุ์ RRIM 623 (RRIM 600/ RRIM 623) มีระดับการแสดงออกของยีน *HbPAL* สูงที่สุด มีค่าการแสดงออกของยีนมากกว่า 19 เท่า ในกิ่งตอพันธุ์ดีพันธุ์ RRIT 251 มีการแสดงออกของยีนสูงที่สุดบน ต้นตอพันธุ์พื้นเมืองบางรัก (RRIT 251/ B) มีค่าการแสดงออกของยีนมากกว่า 2.5 เท่า ปริมาณของ สารประกอบฟีนอลิกทั้งในกิ่งพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 ที่ได้รับการติดตากับต้นตอพันธุ์ต่างๆ พบว่าไม่ มีความแตกต่างกัน ในส่วนการเจริญเติบโต และการพัฒนาของกิ่งพันธุ์ดี RRIM 600 และ RRIT 251 หลังการ ติดตา พบว่าการเจริญเติบโต และการพัฒนาหลังการติดตาในกิ่งพันธุ์ดีพันธุ์ RRIM 600 นั้นสูงกว่ากิ่งตอ พันธุ์ดีพันธุ์ RRIT 251 ในกิ่งพันธุ์ดีพันธุ์ RRIM 600 ที่ทำการติดตากับต้นตอพันธุ์ RRIM 600 (RRIM 600/ RRIM 600) มีการเจริญเติบโต และการพัฒนาของตอที่น้อยที่สุด และไม่สอดคล้องกับระดับการแสดงออกของ ยีน *HbPAL* ส่วนในกิ่งตอพันธุ์ดีพันธุ์ RRIT 251 ที่ติดตากับยางพาราพันธุ์พื้นเมืองบางรัก (B) (RRIT 251/ B)

มีการเจริญเติบโต และการพัฒนาของตาน้อยที่สุด สอดคล้องกับการแสดงออกของยีน *HbPAL* ที่มีระดับการแสดงออกที่สูงที่สุด

Thesis Title	The Relationship between <i>PAL</i> Gene Expression and Phenolic Compounds in Compatibility of Different Rubber Rootstock-Scion
Author	Miss Porntip Sangsil
Major Program	Plant Science
Academic Year	2015

## ABSTRACT

*Phenylalanine ammonia-lyase (PAL)* is a key gene in the phenylpropanoid pathway regulated phenolic compound synthesis which involved to responsible for several stresses as well as rootstock/ scion interactions in plants. The aims of this study were to clone and study the relationship between *PAL* gene expression, phenolic compound and growth of different rubber rootstock/ scion after budded. cDNA of *PAL* gene from rubber tree contains a complete open reading frame (ORF) of 2,145 bps which encodes 721 amino acid residues. Homology analysis of the amino acid sequence revealed that the HbPAL protein shared a high identity with *PAL* genes of other plants more than 80%. The expression of *HbPAL* gene was investigated in several rootstocks budded with RRIM 600 and RRIT 251 scions at 7, 14 21 and 28 day after budding. *HbPAL* transcripts were upregulated at 7 day after budding. The highest *HbPAL* transcripts were 19- fold more abundant in the RRIM 600/ RRIM 623 combination, while the highest *HbPAL* transcripts were 2.5 more abundant in the RRIT 251/ B combination. The total phenolic content of several rootstocks budded with RRIM 600 and RRIT 251 scions were not different. Study on growth and development of RRIM 600 and RRIT 251 scions budded on various rootstocks was investigated. RRIM 600/ RRIM 600 combination showed the lowest of growth and development. However, higher growth and development of RRIM 600 scion than RRIT 251 budded on different rootstocks were observed. The result showed that *HbPAL* transcription in the different scion-rootstock combinations not consistent with growth and development in RRIM 600/ RRIM 600



combination. While RRIT 251/ B combination showed the lowest of growth and development and consistent high *HbPAL* transcription.

## กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ ดร.กรกช นาคคนอง ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ เป็นอย่างสูงที่กรุณาให้คำแนะนำในการค้นคว้าวิจัย และแก้ไขปัญหาต่างๆ รวมทั้งอบรมสั่งสอน แนะนำแนวทางสำหรับการวิจัย การตรวจทานแก้ไข และการเขียนวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.จรัสศรี นวลศรี กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้ คำปรึกษาแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ ดร.เสาวภา ต้วงปาน ประธานกรรมการสอบ วิทยานิพนธ์ และดร. ธัญญ์วณิช ธัญสิริวรรณ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ซึ่งวิทยานิพนธ์นี้ ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรสำนักพัฒนา บัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

ขอขอบพระคุณสถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร และทรัพยากรธรรมชาติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ และภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ ให้ความอนุเคราะห์ สนับสนุนเงินทุนในการทำวิทยานิพนธ์ และให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ ตลอดจน วัสดุอุปกรณ์ต่างๆ

ขอขอบคุณ คุณชัยพร วรรณมาโส จากศูนย์วิจัยยางสงขลาที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการ ติดต่ายางพาราจนสามารถทำงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และศูนย์วิจัยยางสงขลาที่ เอื้อเพื่อกิ่งต่ายางพันธุ์ดีในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ นางสาวพรรณนิสา จันทร์ดำ นางสาวชุตติมา สว่างภิกขุ และนางสาว เบญจวรรณ เลหาสกุล เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ จากภาควิชาพืชศาสตร์ และภาควิชาการจัดการศัตรูพืช ทุกคนที่ได้ ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ น้องชาย และครอบครัว ที่ให้การสนับสนุน ช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน ทั้งคอยให้กำลังใจ ผลักดัน และคอยเป็นที่ปรึกษาโดยตลอดจนสำเร็จการศึกษา

พรทิพย์ แสงศิลป์

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(7)
กิตติกรรมประกาศ	(9)
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการรูปประกอบ	(12)
รายการรูปประกอบภาคผนวก	(16)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	5
วัตถุประสงค์	28
2. วิธีการวิจัย	29
วัสดุและอุปกรณ์	29
วิธีดำเนินการ	36
3. ผล	55
4. วิจารณ์	86
5. สรุปและข้อเสนอแนะ	95
เอกสารอ้างอิง	98
ภาคผนวก	108
ประวัติผู้เขียน	117

## รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	พันธุ์ของยางพาราที่ทำการทดลอง และแหล่งที่มาของยางพารา	30
2	ไพรเมอร์ที่ออกแบบเพื่อใช้ในการโคลนยีน <i>PAL</i>	39
3	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>PAL</i> จากบริเวณส่วนเปลือกของยางพารากับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม nucleotide blast	59
4	ผลสำเร็จของการติดตาม และจำนวนวันแตกยอดใหม่ของยางพาราพันธุ์พื้นเมืองต่างๆ กับกิ่งพันธุ์ดีพันธุ์ RRIM 600	77
5	ผลสำเร็จของการติดตาม และจำนวนวันแตกยอดใหม่ของยางพาราพันธุ์พื้นเมืองต่างๆ กับกิ่งพันธุ์ดีพันธุ์ RRIT 251	77

## รายการรูปประกอบ

รูปที่		หน้า
1	ลักษณะประจำพันธุ์ยาง RRIM 600	7
2	ลักษณะประจำพันธุ์ยาง RRIT 251	8
3	ต้นยางที่แสดงอาการโรครากขาว	10
4	ขั้นตอนการติดตามเชื้อ	16
5	ตัวอย่างลักษณะอาการผิดปกติของพืชเนื่องจากความล้มเหลวของการเกิดรอยเชื่อม	20
6	วิธีของ phenylpropanoid ในการสร้างสารทุติยภูมิต่างๆ	24
7	ตัวอย่างการเจริญเติบโตของต้นตอยางพาราในแปลงทดลองเพื่อใช้สำหรับการติดตาม	29
8	แสดงต้นตอพันธุ์พื้นเมืองที่ได้รับการติดตามจากกิ่งตอพันธุ์ดี	36
9	แสดงการเก็บส่วนของเปลือกยางบริเวณที่ทำการติดตามสำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอ และตรวจสอบปริมาณพีโนลิก	37
10	ผลการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จาก cDNA ส่วนเปลือกของยางพารา อุณหภูมิที่เหมาะสมของไพรเมอร์ PAL1_Forward primer และ PAL6_Reverse primer คือ 55 องศาเซลเซียส และได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,352 นิวคลีโอไทด์ เมื่อเปรียบเทียบกับ GeneRuler 100 bp DNA Ladder (M)	56
11	ผลการสกัดแยกผลผลิตพีซีอาร์ออกจากเจล และการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยใช้ E.Z.N.A <sup>®</sup> Gel Extraction Kit ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,352 นิวคลีโอไทด์ เมื่อเปรียบเทียบกับ GeneRuler 100 bp DNA Ladder (M)	56
12	ผลการตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอบางส่วนของยีน PAL ที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ RBC TA cloning จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler 100 bp DNA Ladder (M)	57
13	ผลการสกัดแยกดีเอ็นเอสายผสม pTA- PAL จากแบคทีเรีย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 $\alpha$ เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler 100 bp DNA Ladder (M)	57
14	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PAL บริเวณส่วนกลางยีนขนาด 1,372 นิวคลีโอไทด์	58

## รายการรูปประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
15	ผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์จากการทำ 3' RACE PCR ในการสังเคราะห์ยีนด้านปลาย 3'	61
16	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>PAL</i> ด้านปลาย 3' ขนาด 970 นิวคลีโอไทด์ โดยมีรหัสหยุด (stop codon) คือ TAA	62
17	ผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการสังเคราะห์ยีน <i>PAL</i> ด้านปลาย 5' ของยางพาราที่ อุณหภูมิ 61.3 องศาเซลเซียสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler 100 bp DNA Ladder	63
18	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>PAL</i> ด้านปลาย 5' ของยางพารา ขนาด 444 นิวคลีโอไทด์ที่มีบริเวณส่วนของรหัสเริ่มต้น (start codon) คือ ATG	63
19	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>PAL</i> (ORF) ขนาด 2,145 คู่เบสที่ประกอบด้วย บริเวณประกอบด้วยบริเวณส่วนของ 5' ULR จำนวน 55 นิวคลีโอไทด์ ก่อนหน้า บริเวณรหัสเริ่มต้น คือ ATG และบริเวณส่วนของ 3' ULR จำนวน 143 นิวคลีโอไทด์ จากบริเวณรหัสหยุด คือ TAA และแปลรหัสเป็นโปรตีนได้ขนาด 721 กรดอะมิโน	65
20	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนโปรตีน <i>PAL</i> ของยางพารากับพืชชนิด อื่นๆ ที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม GeneDoc	66
21	แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของโปรตีน <i>PAL</i> จากยางพารา ( <i>Hevea brasiliensis</i> ) กับโปรตีน <i>PAL</i> ในพืชอื่นๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม MEGA 6 ตัวเลขบนแขนง (node) แสดงเปอร์เซ็นต์ความ น่าเชื่อถือจากการคำนวณด้วย Bootstrap root test จำนวน 1,000 รอบ	67
22	ผลการตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ query_F3 และ query_R3 สำหรับมาใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน 18s rRNA (A) และยีน <i>PAL</i> (B) ด้วยเทคนิค qRT-PCR	68
23	แสดงระดับการแสดงออกของยีน <i>HbPAL</i> ในต้นยางพาราพันธุ์ต่างๆ ที่ทำการติดตาม ด้วยกิ่งพันธุ์ RRIM 600 (heterograft) และต้นตอพันธุ์ RRIM 600 ที่ทำการติดตาม ด้วยตาของกิ่งพันธุ์ RRIM 600 (homograft) ทำการเปรียบเทียบกับต้นยางพารา พันธุ์ต่างๆ และพันธุ์ RRIM 600 ที่ไม่ได้ทำการติดตาม บริเวณส่วนเปลือกที่เกิดรอย เชื่อมประสานกัน	69

## รายการรูปประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
24	แสดงระดับการแสดงออกของยีน <i>HbPAL</i> ในต้นยางพาราพันธุ์ต่างๆ ที่ทำการติดตาด้วยตาด้วยกิ่งพันธุ์ RRIT 251 (heterograft) และต้นตอพันธุ์ RRIT 251 ที่ทำการติดตาด้วยตาของกิ่งพันธุ์ RRIT 251 (homograft) ทำการเปรียบเทียบกับต้นยางพาราพันธุ์ต่างๆ และพันธุ์ RRIT 251 ที่ไม่ได้ทำการติดตา บริเวณส่วนเปลือกที่เกิดรอยเชื่อมประสานกัน	70
25	แสดงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mg/g) ในต้นตอยางพาราพันธุ์ต่างๆ ที่ทำการติดตาด้วยกิ่งพันธุ์ RRIM 600 (heterograft) และต้นยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ที่ทำการติดตาด้วยกิ่งพันธุ์ดี พันธุ์ RRIM 600 (homograft) ทำการเปรียบเทียบกับต้นยางพาราพันธุ์ต่างๆ และพันธุ์ RRIM 600 ที่ไม่ได้ทำการติดตา	72
26	แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg/g) ในต้นตอยางพาราพันธุ์ต่างๆ ที่ทำการติดตาด้วยกิ่งพันธุ์ RRIT 251 (heterograft) และต้นยางพาราพันธุ์ RRIT 251 ที่ทำการติดตาด้วยกิ่งพันธุ์ดี พันธุ์ RRIT 251 (homograft) ทำการเปรียบเทียบกับต้นยางพาราพันธุ์ต่างๆ และพันธุ์ RRIT 251 ที่ไม่ได้ทำการติดตา	72
27	ผลการตรวจสอบดูการเจริญเติบโตของแผ่นตาหลังการติดตา 21 วัน	73
28	ลักษณะการเจริญเติบโต และการพัฒนาของเนื้อเยื่อบริเวณรอยต่อระหว่างแผ่นตาของกิ่งพันธุ์ดีกับเนื้อเยื่อของต้นตอพันธุ์ต่างๆ หลังจากการติดตา	75-76
29	ความสูงของยอดหลังจากการแตกตาใหม่ของกิ่งพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตอพันธุ์ RRIM 600 (homograft) และต้นตอยางพาราพันธุ์ต่างๆ	79
30	ความสูงของยอดหลังจากการแตกตาใหม่ของกิ่งพันธุ์ RRIT 251 บนต้นตอพันธุ์ RRIT 251 (homograft) และต้นตอยางพาราพันธุ์ต่างๆ	79
31	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของยอดหลังจากการแตกตาใหม่ของกิ่งพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตอพันธุ์ RRIM 600 (homograft) และต้นตอยางพาราพันธุ์ต่างๆ	81
32	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของยอดหลังจากการแตกตาใหม่ของกิ่งพันธุ์ RRIT 251 บนต้นตอพันธุ์ RRIT 251 (homograft) และต้นตอยางพาราพันธุ์ต่างๆ	81

**รายการรูปประกอบ (ต่อ)**

<b>รูปที่</b>		<b>หน้า</b>
33	จำนวนใบหลังจากการแตกตาใหม่ของกิ่งพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตอพันธุ์ RRIM 600 (homograft) และต้นตออย่างพาราพันธุ์ต่างๆ	83-84
34	จำนวนใบหลังจากการแตกตาใหม่ของกิ่งพันธุ์ RRIT 251 บนต้นตอพันธุ์ RRIT 251 (homograft) และต้นตออย่างพาราพันธุ์ต่างๆ	85
35	การเจริญเติบโต และการพัฒนาของตากิ่งพันธุ์ RRIM600 และ RRIT251 หลังจากทำการตัดยอดต้นตอพันธุ์ต่างๆ	85



## รายการรูปประกอบภาคผนวก

รูปที่		หน้า
1	แผนที่ของพลาสมิดเวคเตอร์ RBC TA cloning vector (RBC Bioscience, ใต้หวัน)	108
2	กราฟมาตรฐานสารละลายกรดแกลลิกสำหรับคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในรูปของ GAE (gallic acid equivalent)	113
3	การเจริญเติบโต และการพัฒนาทางลำต้นของกิ่งต่าพันธุ์ RRIM 600 ที่ทำการติดตามบนต้นตออย่างพาราพันธุ์พื้นเมืองบางรัก (A), ยางพาราพันธุ์พื้นเมืองควนמדแดง (B), พันธุ์ RRIM 623 (C) และต้นตออย่างพาราพันธุ์ RRIM 600 (D) ในภาพรวมหลังจากการแตกยอดใหม่ 12 สัปดาห์	115
4	การเจริญเติบโต และการพัฒนาทางลำต้นของกิ่งต่าพันธุ์ RRIT 251 ที่ทำการติดตามบนต้นตออย่างพาราพันธุ์พื้นเมืองบางรัก (A), ยางพาราพันธุ์พื้นเมืองควนמדแดง (B), พันธุ์ RRIM 623 (C) และต้นตออย่างพาราพันธุ์ RRIM 600 (D) ในภาพรวมหลังจากการแตกยอดใหม่ 12 สัปดาห์	116

## บทที่ 1

### บทนำ

#### บทนำต้นเรื่อง

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สร้างรายได้ให้กับประเทศไทย นอกจากนี้ยังมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจ และชีวิตความเป็นอยู่ของประชากรไทยเป็นอย่างมาก ปัจจุบันประเทศไทยนับได้ว่าเป็นประเทศที่ผลิตยางพารามากที่สุดในโลก คือปีละ 2.5 ล้านตันซึ่งคิดเป็น 1 ใน 3 ของผลผลิตทั่วโลก พื้นที่ในประเทศทั้งหมด 22.18 ล้านไร่ ส่วนใหญ่เป็นพื้นที่ในภาคใต้ (13.94 ล้านไร่) (สถาบันวิจัยยาง, 2557) โดยทั่วไปการปลูกสร้างสวนยางมักใช้ต้นตอตายาง (budded stump) ซึ่งได้จากการนำเมล็ดตายางพันธุ์พื้นเมืองมาเพาะ และติดตามโดยใช้กิ่งตาจากต้นพันธุ์ดี ทำให้ได้ต้นที่ตรงตามพันธุ์ ในอดีตต้นตอส่วนใหญ่ได้มาจากยางพาราพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งเป็นพันธุ์ผสมเปิด มีฐานพันธุ์กรรมกว้าง ระบบรากมีความแข็งแรง ทนทานต่อโรครากได้ดี จึงเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นต้นตอในการปลูกยางพารา แต่ในปัจจุบันต้นตอส่วนใหญ่ได้มาจากเมล็ดของต้นยางพันธุ์ดีคือ RRIM 600 ซึ่งส่วนใหญ่ระบบรากของยางพันธุ์ดีจะมีความแข็งแรงน้อย ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เกิดความเสี่ยงต่อการระบาดของโรคราก ต้นตอพันธุ์ดีทั้งหมดอาจถูกทำลายได้เนื่องจากมีพันธุ์กรรมที่ใกล้เคียงกัน เพราะจากการศึกษาเกี่ยวกับการเข้าทำลายของโรคราก เช่น โรครากขาว (white root disease) พบว่าไม่มียางพันธุ์แนะนำใดที่ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพันธุ์ RRIM 600 มีความอ่อนแอมาก (อุไร และคณะ, 2538) ซึ่งจะเกิดผลเสียหายร้ายแรงสำหรับการปลูกยางในประเทศ

มีรายงานการระบาดของโรครากขาวในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตภาคใต้ซึ่งมีฝนตกชุก และสภาพอากาศเหมาะแก่การเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุดังกล่าว โดยพบพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคกระจายอยู่ในหลายจังหวัด ได้แก่ จังหวัดชุมพร, สุราษฎร์ธานี, ระนอง, นครศรีธรรมราช, สงขลา, กระบี่ และสตูล โดยเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคนี้คือ เชื้อรา *Rigidoporus microporus* ซึ่งสามารถเข้าทำลายรากยางพาราได้ทุกระยะการเจริญเติบโต ตั้งแต่อายุ 1 ปีขึ้นไป ซึ่งในระยะเริ่มแรกจะไม่เห็นลักษณะผิดปกติของต้นยางพาราส่วนที่อยู่เหนือพื้นดิน เมื่อรากถูกทำลายจนเสียหายจึงทำให้ไม่สามารถดูดน้ำ และธาตุอาหารได้จึงแสดงอาการใบเหลือง และใบร่วง สำหรับต้นยางเล็กที่เป็นพุ่มใบทั้งหมดจะมีสีเหลืองผิดปกติ ซึ่งเป็นระยะที่รุนแรง และไม่สามารถรักษาได้ (อยุทธ์ และเสมอใจ, 2554)

นอกจากการคัดเลือกต้นตอยางพาราที่มีการเจริญเติบโตที่ดี และมีศักยภาพในการต้านทานโรครากแล้ว ยังพบว่ายางพาราที่ใช้ในการผลิตต้นตอแต่ละพันธุ์มีความสามารถในการเข้ากันได้กับกิ่งพันธุ์ที่แตกต่างกันด้วย จรินทร์ และคณะ (2540) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของต้นตอกับกิ่งพันธุ์ เพื่อทดลองหาต้นตอยางที่มีการเจริญเติบโตได้ดี มีผลการติดตามสำเร็จสูง และส่งเสริมให้ได้รับผลผลิตสูง โดยทำการทดลองด้วยการติดตามยางพันธุ์ดี (scion) 6 พันธุ์ คือ GT1, PR255, RRIM 600, PR261, PB5/51 และ PB235 พันธุ์ยางสำหรับต้นตอ (rootstock) 4 พันธุ์ คือ GT1, PB5/51, RRIM 600 และ PR255 ผลการทดลองพบว่า เมล็ดยางพันธุ์ GT1, RRIM 600, PB5/51 และ PR255 ที่เก็บจากสวนยางขนาดเล็กสามารถใช้เป็นต้นตอเพื่อขยายพันธุ์ได้ดี โดยเมล็ดยางพันธุ์ GT1 เหมาะสมที่จะใช้เป็นต้นตอของยางพันธุ์ PB235 และ RRIM 600 เมล็ดยางพันธุ์ PB5/51 เหมาะสมที่จะใช้เป็นต้นตอของยางพันธุ์ PB235 และ PR255 เมล็ดยางพันธุ์ RRIM 600 เหมาะสมที่จะใช้เป็นต้นตอของยางพันธุ์ RRIM 600 และ PB235 เมล็ดยางพันธุ์ PR255 เหมาะสมที่จะใช้เป็นต้นตอของยางพันธุ์ RRIM 600 รัชนิกร และ จรัสศรี (2555) ได้ศึกษาอิทธิพลของต้นตอยางพาราพันธุ์พื้นเมืองจาก 5 แหล่งที่มาในภาคใต้ ต่อการเจริญเติบโตของกิ่งตา RRIM 600 พบว่าการตอบสนองในด้านการเจริญเติบโตของพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตอพันธุ์ต่างๆ มีความแตกต่างกันซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Sobhana และคณะ (2001) ที่ศึกษาผลของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ของยางพารา ต่อลักษณะทางสรีรวิทยา และชีวเคมีของยางพารา 5 พันธุ์ พบว่าความแตกต่างของ  $CO_2$  assimilation rate เป็นอิทธิพลที่เกิดจากต้นตอ และพบว่า ปริมาณน้ำตาล (total soluble sugars และ reducing sugars), สารประกอบฟีนอล และปริมาณกรดอะมิโน ที่แตกต่างกันเกิดจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ เช่นเดียวกับ Goncalves และ Martins (2002) ที่รายงาน ว่า ผลผลิตของยางพารามีความแตกต่างกันประมาณ 18-20% จากการใช้ต้นตอพันธุ์ต่างๆ แสดงให้เห็นว่าต้นตอมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโต และผลผลิตน้ำยาง อีกทั้งต้นตอที่ดีสามารถเข้ากันได้ดีกับกิ่งตาพันธุ์ดี ทำให้การเจริญเติบโตทางด้านลำต้นในระยะแรกรวดเร็ว ส่งผลให้ยางพาราสามารถตั้งตัวได้เร็ว และมีการเจริญเติบโตดีในแปลงปลูกโดย Goncalves และ Martin (2002) กล่าวว่า พันธุ์ RRIM 600 เป็นพันธุ์ที่มีความสามารถเข้ากันได้ดีกับต้นตอหลายพันธุ์ แต่จากการทดลองพบว่าการใช้ต้นตอพันธุ์ IAN873 จะให้ผลดีที่สุด นอกจากนี้ Cardinal และคณะ (2007) รายงานว่า การติดตามพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตอพันธุ์ PB235 ให้ผลผลิตสูงที่สุด รองลงมาคือ การติดตามพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตอพันธุ์ IAN873

Darikova และคณะ (2011) สรุปว่า ปัญหาของความเข้ากันไม่ได้ของเนื้อเยื่อระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี อาจมีผลทำให้เกิดลักษณะอาการตายจากยอด (dieback) ของต้น

พืชหลังจากปลูก โดยพบว่าเมื่อมีการติดตามหรือทาบกิ่ง พืชจะมีการกระตุ้นให้ผลิตสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) เนื่องจากการเกิดบาดแผล โดยพืชจะมีการหลั่งสารประกอบจำพวกฟีนอล หากพบปริมาณฟีนอลในบริเวณที่มีการติดตามมาก จะส่งผลให้เกิดความไม่เข้ากันของเนื้อเยื่อ หรือที่เรียกว่า incompatibility ได้ (Errea, 1998) จึงมีการใช้ปริมาณฟีนอลจากบริเวณส่วนบน และส่วนล่างของรอยต่อที่เกิดจากการทาบกิ่งหรือติดตาม เป็นตัวตรวจสอบความเข้ากันได้ของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีในไม้ผลหลายชนิด เช่น แอปริคอต (Usenik, et al., 2006) และ *Uapaca kirkiana* (Mngomba, et al., 2008) ซึ่งสารประกอบฟีนอลในพืชจะถูกสังเคราะห์โดยเอนไซม์ *Phenylalanine ammonia lyase (PAL)* ดังนั้นจึงมีการประยุกต์ใช้การตรวจสอบการแสดงออกของเอนไซม์ดังกล่าว ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สังเคราะห์เอนไซม์ตัวแรกในชีวสังเคราะห์ phenylpropanoid ที่ทำหน้าที่ในการสร้างสารประกอบทุติยภูมิ (secondary metabolite) หลายชนิด เช่น ฟีนอล, แอนโทไซยานิน, ฟลาโวนอยด์ และลิกนิน เป็นต้น Pina และ Errea (2008) พบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของเอนไซม์ *PAL* ต่อการทาบกิ่งแคลลัสแอปริคอตในหลอดทดลอง โดยพบว่าหากมีการแสดงออกของเอนไซม์ดังกล่าวจะทำให้เนื้อเยื่อสามารถเจริญเข้ากันได้ นอกจากนี้ Dos Santos Pereira และคณะ (2014) ศึกษาการทาบกิ่งในพืชที่มีการทาบกิ่งด้วยต้นตอพืชชนิดต่างๆ และต้นตอที่เป็นแอปริคอต เมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของเอนไซม์ *PAL* ในส่วนด้านบน และด้านล่างของบริเวณที่ทำการทาบกิ่ง พบว่ามีการแสดงออกของเอนไซม์ *PAL* ในปริมาณที่สูงในต้นตอแอปริคอตเมื่อเทียบกับต้นตอที่เป็นพืช ซึ่งส่งผลให้เกิดการสะสมสารประกอบฟีนอลิก และทำให้เกิดความไม่เข้ากันของต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี ดังนั้นการศึกษากการแสดงออกของเอนไซม์ *PAL* หลังทำการติดตามที่ระยะเวลาต่างๆ จึงอาจนำมาใช้ในการตรวจสอบความเข้ากันได้ของต้นตออย่างพาราพันธุ์ต่างๆ และกิ่งพันธุ์ดี หากพบว่าการแสดงออกของเอนไซม์ดังกล่าวสอดคล้องกับความเข้ากันได้ของต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี อาจนำมาประยุกต์ใช้ในการทำนายเบื้องต้นถึงระดับความเข้ากันได้ เพื่อคัดเลือกต้นตอที่สามารถเข้ากันได้กับกิ่งพันธุ์ดี นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของรอยต่อระหว่างต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี เช่น ปริมาณลิกนินที่สร้างขึ้นระหว่างการเชื่อมตอรอยแผลจะช่วยให้เกิดการเชื่อมรอยต่อที่แข็งแรงในต้นตอ และกิ่งพันธุ์ที่สามารถเข้ากันได้ดี (Buchloh, 1960) โดยพบว่าหากมีสารฟลาโวนอยด์ ในปริมาณสูง และมีปริมาณลิกนินต่ำจะทำให้เกิดปัญหาในการเชื่อมของรอยต่อระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ นอกจากนี้ Aloni และคณะ (2010) รายงานว่าฮอร์โมนออกซิน มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์บริเวณรอยเชื่อมของต้นตอและกิ่งพันธุ์ดีให้เปลี่ยนไปเป็นท่อลำเลียงอาหาร

ดังนั้นการคัดเลือกพันธุ์ยางพาราที่มีระบบรากที่สมบูรณ์แข็งแรง เจริญเติบโต รวดเร็ว และมีศักยภาพในการทนทานต่อการเข้าทำลายของโรครากขาวที่จะช่วยลดความรุนแรง และการระบาดของโรคได้ โดยเฉพาะยางพาราพันธุ์พื้นเมืองที่ต้านทานต่อโรครากได้ดี แต่ต้นตอ ยางพาราพันธุ์พื้นเมืองอาจมีพันธุกรรมแตกต่างจากยางพาราพันธุ์ที่นิยมปลูกกันทั่วไปในปัจจุบัน ได้แก่ RRIM 600 และ RRIT 251 จึงส่งผลทำให้เกิดการเข้ากันไม่ได้ (incompatibility) ระหว่าง ต้นตอ และกิ่งตายางพาราพันธุ์ดี โดยทั่วไปแล้วเมื่อทำการติดตา พืชจะมีกระบวนการสร้างสาร จำพวกฟีนอล เนื่องจากการเกิดบาดแผล หากมีการสร้างสารฟีนอลในปริมาณสูง จะส่งผลให้เกิด ความไม่เข้ากันของเนื้อเยื่อได้ ดังนั้น การศึกษาโอกาสการเกิดความเข้ากันไม่ได้ของเนื้อเยื่อจาก ปริมาณของสารประกอบฟีนอล ควบคู่กับตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่สังเคราะห์สารฟีนอล ในพืช คือ *Phenylalanine ammonia lyase (PAL)* หลังจากมีการติดตา รวมทั้งข้อมูลการพัฒนา ของกิ่งพันธุ์ดีบนต้นตอ เพื่อเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกต้นตอที่เหมาะสมสำหรับการปลูกสร้าง สวนยางพาราอย่างยั่งยืน

## การตรวจเอกสาร

### 1. การปลูกยางพาราของประเทศไทย

“ยางพารา” เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกยางพารา ในปี 2556 ทั้งสิ้น ประมาณ 22.2 ล้านไร่ โดยผลผลิตยางพาราส่วนใหญ่อยู่ที่ภาคใต้ ซึ่งมีพื้นที่ปลูก 13.9 ล้านไร่ คิดเป็นร้อยละ 62.8 ของประเทศ (จังหวัดสงขลามากที่สุด) และปัจจุบันมีการขยายพื้นที่การปลูกสู่ภูมิภาคอื่นๆ มากขึ้น โดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพื้นที่ปลูก 4.4 ล้านไร่ คิดเป็นร้อยละ 19.8 ซึ่งเป็นอันดับ 2 ของประเทศ รองลงมาได้แก่ ภาคกลาง และภาคเหนือ มีพื้นที่ปลูก 2.6 และ 1.2 ล้านไร่ คิดเป็นร้อยละ 11.8 และ 5.5 ของประเทศ ตามลำดับ (สำนักพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, 2558)

ปัจจุบันผลผลิตของยางพาราลดลงเนื่องจากการผันแปรของสภาพภูมิอากาศ ทำให้ฤดูเปิดกรีดล่าช้า และน้ำยางออกน้อย ขณะเดียวกันผลผลิตยางของประเทศอื่นเริ่มทรงตัวจากราคายางโลกที่ตกต่ำอย่างต่อเนื่อง และนโยบายภาครัฐในหลายประเทศเริ่มตระหนักถึงปัญหาผลผลิตยางล้นตลาดมากขึ้น ทำให้เกษตรกรบางส่วนเลิกกรีดยาง และเจ้าของสวนยางใหม่ชะลอการเปิดกรีด (กฤษฎี, 2559) สถานการณ์ราคายางที่ตกต่ำเป็นปัญหาที่กระทบต่อความเป็นอยู่ของเกษตรกร ทำให้เกิดกระแสเรียกร้องต่างๆ ให้แก้ปัญหาราคายาง ทั้งในเรื่องของการแปรูปยางเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มมูลค่าผลผลิตยาง และลดการพึ่งพาการส่งออกยางโดยผลักดันให้มีการบริโภคยางในประเทศให้มากขึ้น อย่างไรก็ตาม การวิจัยในส่วนต้นน้ำยังคงมีความสำคัญเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงแก่เกษตรกรชาวสวนยาง ซึ่งโรครากขาวยังคงเป็นโรคที่ยังพบมากในพื้นที่ปลูกยางทางภาคใต้ และเป็นโรคที่ทำความเสียหายต่อสวนยาง และส่งผลกระทบต่อผลผลิตน้ำยางอย่างรุนแรง และยังไม่มีความมาตรการลดหรือป้องกันการระบาดของโรครากขาวอย่างมีแบบแผน เป็นผลทำให้โรคแพร่กระจายออกสู่วงกว้างมากขึ้นทุกปี วิธีการแก้ไขปัญหาคือการป้องกันมิให้เชื้อมีการระบาดเพิ่มขึ้น หรือทำลายเชื้อที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรครากให้มีปริมาณลดลงเรื่อยๆ การรักษาต้นที่เป็นโรค และเฝ้าระวังการระบาดของโรค (สถาบันวิจัยยาง, 2558) รวมทั้งการศึกษาคัดเลือกพันธุ์ยางที่สามารถทนทานต่อโรคได้

## 2. พันธุ์ยาง

### 2.1 ยางพาราพันธุ์ RRIM 600

พันธุ์ยาง RRIM 600 มีถิ่นกำเนิดในสหพันธรัฐมาเลเซีย ได้จากการผสมระหว่าง พันธุ์ Tjir1 และ PB 86

**ลักษณะประจำพันธุ์:** ทรงจัดรูปกรวยขนาดของจักรเล็ก ใบสีเขียวอมเหลือง เส้นกลางใบนูนฐานใบสอบเรียว ปลายใบเป็นติ่งแหลม ลักษณะแผ่นใบเรียบรูปร่างของใบกลางป้อมปลายใบขอบใบเรียบ รูปร่างของก้านใบตรง ความยาวก้านใบปานกลาง รอยแผลก้านใบรูปหัวใจ ตาก้านใบนูนน้อยตั้งอยู่ในฐานก้านใบ ตาคิ้วฝังในลำต้น ทิศทางของตาคิ้วโค้งสมดุลง่าย สีขาว รูปร่างของลำต้นตรง ลักษณะทรงพุ่มรูปพัด ความหนาแน่นของทรงพุ่มปานกลาง การแตกกิ่งสมดุลง่าย ขนาดเมล็ดปานกลางรูปร่างของเมล็ดทรงสี่เหลี่ยม ลักษณะส่วนหัวเรียบ ลักษณะส่วนท้ายเรียบ ลักษณะส่วนนอกสั้นนูน ลักษณะส่วนหลังเรียบ (วิชา และคณะ, 2545) (รูปที่ 1)

**ลักษณะทางการเกษตร:** ในระยะก่อนเปิดกรีดและระหว่างกรีดการเจริญเติบโตปานกลาง เปลือกเดิมบาง เปลือกงอกใหม่หนาปานกลาง ผลผลิตระยะแรกอยู่ในระดับปานกลาง แต่จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในปีต่อมาให้ผลผลิตเนื้อยาง 10 ปีกรีดเฉลี่ย 289 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี อ่อนแอมากต่อโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อไฟทอปโทราและโรคเส้นดำ ต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุดนูนระดับปานกลาง อ่อนแอต่อโรคราสีชมพู ต้านทานลมระดับปานกลาง

**ลักษณะดีเด่น:** การปรับตัวและให้ผลผลิตได้ดีในเกือบทุกพื้นที่ ทนทานต่อการกรีดถี่ได้มากกว่าพันธุ์อื่นๆ และมีจำนวนต้นแสดงอาการเปลือกแห้งน้อย

**ข้อจำกัด/ข้อควรระวัง:** อ่อนแอมากต่อโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อไฟทอปโทรา โรคเส้นดำ และอ่อนแอต่อโรคราสีชมพู เปลือกเดิมบาง

**พื้นที่แนะนำ:** ปลูกได้ในพื้นที่ทั่วไป ยกเว้นในพื้นที่ที่มีโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อไฟทอปโทรา เส้นดำ และโรคราสีชมพูระบาดรุนแรง พื้นที่ที่มีหน้าดินตื้น และพื้นที่ที่มีระดับน้ำใต้ดินสูง (สถาบันวิจัยยาง, 2554)



รูปที่ 1 ลักษณะประจำพันธุ์ยาง RRIM 600

ที่มา สถาบันวิจัยยาง (2554)

## 2.2 ยางพาราพันธุ์สถาบันวิจัยยาง 251 (RRIT 251)

พันธุ์ยาง RRIT 251 ไม่สามารถระบุพ่อแม่พันธุ์ได้ มีแหล่งกำเนิดในประเทศไทย เป็นต้นกล้ายางที่คัดเลือกจากแปลงเอกชนในจังหวัดสงขลา

**ลักษณะประจำพันธุ์:** ลักษณะทรงฉัตรครึ่งวงกลม ขนาดของฉัตรใหญ่ ใบสีเขียวแก่ เส้นกลางใบนูน ฐานใบรูปปลีมี ปลายใบเรียวแหลม ลักษณะแผ่นใบเรียบ ขอบใบเป็นคลื่น ใบย่อยซ้าย-ขวา เปรียบเทียบกับใบกลางมีรูปร่างแบบเดียวกัน แต่ขนาดเล็กกว่า รูปร่างก้านใบรูปตัวเอส ความยาวก้านใบยาว ฐานก้านใบเรียบสองชั้น รอยแผลก้านใบรูปหัวใจ ลักษณะการแผ่ของก้านใบย่อย ยกขึ้นทำมุมแคบระหว่างก้านใบย่อย ความยาวก้านใบย่อยปานกลาง ตาก้านใบนูนน้อยตั้งอยู่ชิด ฐานก้านใบ ตาคิ้วเสมอลำต้น ทิศทางของตาคิ้วเฉียงด้านใดด้านหนึ่ง น้ำยางสีขาว ลักษณะทรงพุ่ม รูปกลม ความหนาแน่นของทรงพุ่มขนาดใหญ่ การแตกกิ่งไม่สมดุล (วิชา และคณะ, 2545) (รูปที่ 2)



**ลักษณะทางการเกษตร:** ระยะก่อน และระหว่างกรีตเจริญเติบโตปานกลาง ขนาดลำต้นทั้งแปลง มีความสม่ำเสมอดี ทำให้มีจำนวนต้นเปิดกรีดได้มาก เปลือกเดิม และเปลือกงอกใหม่หนา ปานกลาง ผลผลิตเนื้อยาง 10 ปีกรีดเฉลี่ย 457 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี สูงกว่าพันธุ์ RRIM 600 ร้อยละ 57 มีจำนวนต้นเปลือกแห้งน้อย ด้านทานโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อไฟทอปโทรา โรคราแป้ง โรคใบจุดนูน และโรคราสีชมพูระดับปานกลาง ด้านทานโรคเส้นดำระดับดี และด้านทานลมระดับปานกลาง

**ลักษณะดีเด่น:** ผลผลิตเนื้อยางสูงมาก มีจำนวนต้นเปิดกรีดได้มาก ด้านทานโรคเส้นดำในระดับดี มีจำนวนต้นเปลือกแห้งน้อย

**ข้อจำกัด/ข้อควรระวัง:** ในระยะยางอ่อน ต้นยางที่ปลูกในพื้นที่ฝนตกชุก ทั้งในแปลงกิ่งตา และแปลงปลูกจะอ่อนแอต่อโรคใบจุดนูนมาก

**พื้นที่แนะนำ:** ปลูกได้ในพื้นที่ทั่วไป ยกเว้นพื้นที่ลาดชัน พื้นที่ที่มีหน้าดินตื้น พื้นที่ที่มีระดับน้ำใต้ดินสูง และพื้นที่ลมแรง เนื่องจากทรงพุ่มมีขนาดใหญ่ แตกกิ่งไม่สมดุล (สถาบันวิจัยยาง, 2554)

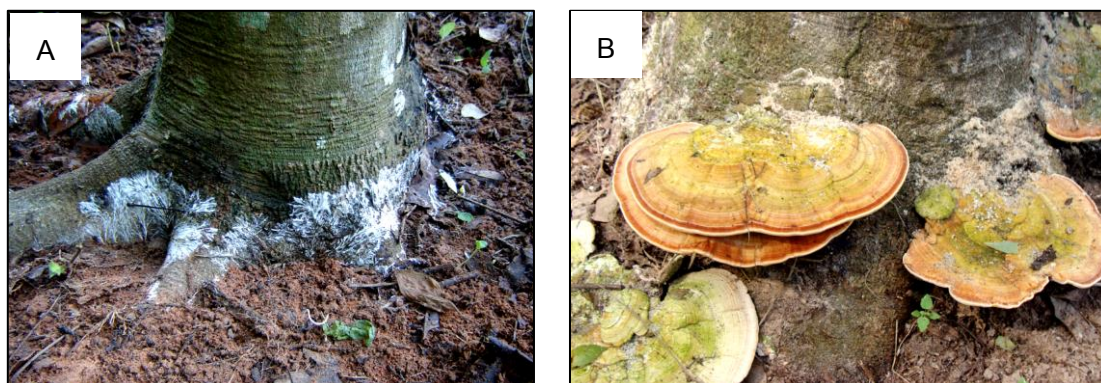


รูปที่ 2 ลักษณะประจำพันธุ์ยาง RRIT 251

ที่มา สถาบันวิจัยยาง (2554)

### 3. โรครากขาวในยางพารา

โรครากเนาเป็นโรคที่ทำความเสียหายให้กับต้นยางมากที่สุดโรคหนึ่งโดยเฉพาะโรครากขาว โรครากขาวของยางพารา เกิดจากเชื้อราชั้นสูงจำพวกเห็ด (basidiomycetes) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Rigidoporus microporus* หรือ *Rigidoporus lignosus* พบการแพร่ระบาด และทำความเสียหายแก่พื้นที่ปลูกยางทั่วไป สามารถพบต้นยางเป็นโรคได้ตั้งแต่ 1-2 ปีแรกปลูก (อุไร และคณะ, 2546) และสามารถเข้าทำลายรากยางพาราได้ทุกระยะการเจริญเติบโต ตั้งแต่อายุ 1 ปีขึ้นไป ในระยะเริ่มแรกจะไม่เห็นลักษณะผิดปกติของต้นยางพาราส่วนที่อยู่เหนือพื้นดิน เมื่อส่วนรากถูกทำลายเสียหายจนไม่สามารถดูดน้ำ และธาตุอาหารได้ จึงแสดงอาการอาการที่ปรากฏคือ ใบมีขนาดเล็กลง สีเหลือง ทรงพุ่มมีขนาดเล็ก (Kaewchai *et al.*, 2010) ต้นยางที่ถูกเชื้อเข้าทำลายอย่างรุนแรง จะแสดงอาการให้เห็นที่ทรงพุ่ม ซึ่งเป็นระยะที่ไม่สามารถรักษาได้ นอกจากทำการป้องกันลำต้นข้างเคียงเท่านั้น ในยางใหญ่ ต้นยางที่ถูกทำลายอย่างรุนแรงจะแสดงอาการใบเหลือง และร่วงแล้วยืนต้นตาย (อุไร และคณะ, 2546) ซึ่งบริเวณรากที่ถูกเชื้อเข้าทำลายจะปรากฏเส้นใยราสีขาวเจริญแตกสาขาปกคลุม เกาะติดแน่นกับผิวราก เมื่อเส้นใยอายุมากขึ้นจะกลายเป็นเส้นกลมมนสีเหลืองซีด เนื้อไม้ของรากที่เป็นโรคในระยะแรกจะแข็งกระด้างเป็นสีน้ำตาลซีดในระยะรุนแรงจะกลายเป็นสีครีมถ้าอยู่ในที่ชื้นแฉะจะอ่อนนิ่ม ดอกเห็ดมีลักษณะเป็นแผ่นครึ่งวงกลมแผ่นเดียวหรือซ้อนกันเป็นชั้นๆ ผิวด้านบนเป็นสีเหลืองส้ม (รูปที่ 3) โดยมีสีเข้มอ่อนเรียงสลับกันเป็นวง ผิวด้านล่างเป็นสีส้มแดงหรือสีน้ำตาล ขอบดอกเห็ดเป็นสีขาว (สถาบันวิจัยยาง, 2558) โดยต้นที่เป็นโรคจะเป็นแหล่งเชื้อแพร่กระจายแก่ต้นข้างเคียงทั้งในแถว และระหว่างแถวต่อไป ซึ่งจะมีการระบาดรุนแรงในช่วงฤดูฝนที่มีฝนตกชุก ความชื้นสูง ทำให้จำนวนต้นยางต่อไร่ลดลง สูญเสียรายได้ทั้งจากผลผลิตน้ำยาง และไม้ยาง นอกจากนี้ ยังต้องเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มเติมในการควบคุม และป้องกันโรคอีกด้วย โรครากขาวในประเทศไทยมีแนวโน้มแพร่ขยาย และระบาดมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่ปลูกยางเดิมซึ่งมีการปลูกยางแทนรอบใหม่ (สถาบันวิจัยยาง, 2556)



รูปที่ 3 ต้นยางที่แสดงอาการโรครากขาว A) กลุ่มเส้นใยสีขาวบริเวณโคนต้น B) ลักษณะดอกเห็ดที่โคนต้น

ที่มา สถาบันวิจัยยาง (2558)

#### 4. การขยายพันธุ์พืชที่ไม่เกี่ยวข้องกับการใช้เพศ

คือวิธีการขยายพันธุ์จากเนื้อเยื่อชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นพืช เช่น ลำต้น ตา ใบ ราก เพื่อให้ได้ต้นพืชที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนเดิมทุกประการด้วยวิธีการตอนกิ่ง การปักชำ การติดตา การต่อกิ่ง และการทาบกิ่ง (กรมวิชาการเกษตร, 2556) ต้น และกิ่งของไม้เนื้อแข็งประกอบด้วยเนื้อเยื่อพิเศษกลุ่มหนึ่งที่เรียกว่า เนื้อเยื่อเจริญ (cambium) เซลล์ในเนื้อเยื่อกลุ่มนี้มีชีวิต และถูกกระตุ้นให้แบ่งตัวสร้างเป็นเซลล์ท่อน้ำ และท่ออาหารทำให้พืชมีการเจริญเติบโตในลักษณะการขยายขนาดของลำต้นและกิ่งอยู่ตลอดเวลา การทำให้เนื้อเยื่อพืชส่วนนี้ได้รับการกระทบกระเทือนเป็นบาดแผล เนื้อเยื่อเจริญจะมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว ทำให้เนื้อเยื่อที่ฉีกขาดประสานตัวกัน และเจริญเติบโตเป็นเนื้อไม้ปกติต่อไป บริเวณลำต้น และกิ่งที่มีเปลือกหุ้ม ชั้นของเนื้อเยื่อเจริญจะอยู่ต่ำลงไปจากผิวเปลือกก่อนถึงชั้นเนื้อไม้แข็ง เมื่อเปิดเปลือกออก และจับดูจะมีลักษณะเป็นเมือกใส สำหรับการติดตา ต่อกิ่ง และทาบกิ่งมีหลักการ คือ ทำให้เนื้อเยื่อเจริญแบ่งเซลล์ออกมาเชื่อมประสานกับเนื้อเยื่อเจริญของต้นตอ และอาศัยรากของต้นตอดูดน้ำ และแร่ธาตุให้การติดตา ต่อกิ่ง ทาบกิ่งหรือการขยายพันธุ์พืชที่ไม่เกี่ยวข้องกับการขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศวิธีอื่นๆ ที่ต้องการให้มีการเชื่อมประสานของเนื้อเยื่อเจริญของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี สิ่งสำคัญเบื้องต้นที่ควบคุมการประสานของเนื้อเยื่อทำให้เข้ากันได้หรือไม่ได้คือ หน่วยพันธุกรรมของต้นตอ และกิ่งหรือตาที่นำมาต่อ การนำพืชต่างต้นมาต่อกันได้นั้น ก่อนอื่นจะต้องทราบก่อนว่าพืชคู่กันนั้นมี

ความสามารถเข้ากันได้เป็นอย่างดี การเข้ากันได้ของพืชบางชนิดอาจไม่แสดงผลออกมาปรากฏในระยะแรกๆ แต่ต่อมาลักษณะของการเข้ากันไม่ได้จะปรากฏให้เห็น เช่น ลักษณะที่ส่วนปลายจากกิ่งที่นำมาต่อ เจริญเติบโตได้เร็วกว่ามีขนาดโตกว่าส่วนโคนซึ่งเป็นส่วนต้นตอมาก หรืออาจแสดงออกมาในทางตรงกันข้ามคือ ส่วนโคนเจริญเติบโตเร็วกว่ามีขนาดโตกว่าส่วนปลาย หรือแสดงออกมาในลักษณะอื่นที่เป็นข้อเสีย เช่น ต้นตอมีผลทำให้ส่วนยอดมีปริมาณ และคุณภาพของผลผลิตของพืชนั้นลดลง เป็นต้น (นงพร, 2535)

การทาบกิ่งหรือการติดตาเป็นศิลปะอย่างหนึ่ง ที่มีการนำระบบราก (rootstock) และระบบยอด (scion) ของพืชมาอยู่บนต้นพืชต้นเดียวกัน โดยการเชื่อมต่อขึ้นส่วนเนื้อเยื่อของพืชทั้ง 2 ชั้นเข้าด้วยกัน สำหรับการติดตาขึ้นส่วนของตา ที่ได้จากกิ่งตัพันธ์ดีจะมีขนาดเล็กกว่าส่วนของต้นตอ เทคนิคการติดตาก็คือเทคนิคที่มาจากกาการทาบกิ่งเพียงแต่ว่าการติดตาจะใช้ขนาดของตาที่เล็กกว่า และมักจะมีเพียงแค่ 1 ตา เท่านั้น (Hartmann *et al.*, 2010)

#### 4.1 ปัจจัยในการขยายพันธุ์พืชที่ไม่เกี่ยวข้องกับการใช้เพศ

นงพร (2535) ได้อธิบายปัจจัยที่มีผลต่อการขยายพันธุ์พืชที่ไม่เกี่ยวข้องกับการใช้เพศ ทั้งปัจจัยภายใน และปัจจัยภายนอกดังนี้

##### 4.1.1 ปัจจัยภายในกิ่ง และต้น

1) ปริมาณสารฮอร์โมนในกิ่ง ได้แก่ ออกซิน ซึ่งถูกผลิตขึ้นที่ปลายยอดหรือปลายกิ่งเมื่อเคลื่อนที่ลงมา ยัง บริเวณรอยตัดของกิ่งปักชำ รอยควั่นของกิ่งตอ หรือรอยเฉือนของกิ่งพันธ์ดีหรือต้นตอจะสะสมอยู่บริเวณนั้นจนมีระดับความเข้มข้นถึงจุดที่เหมาะสมช่วยกระตุ้นให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นแบ่งเซลล์ออกไปอย่างรวดเร็วเมื่อมีฮอร์โมนชนิดอื่นๆ ร่วมด้วยก็จะสร้างเป็นราก และเนื้อเยื่ออื่นๆ ที่จำเป็นของพืชต่อไป

2) ความอุดมสมบูรณ์และการสะสมอาหารของกิ่งและต้น ต้นและกิ่งที่สมบูรณ์มีอาหารสะสมมากจะทำให้ออกรากได้ง่ายและการเชื่อมประสานของเนื้อเยื่อเกิดขึ้นได้ดีกว่ากิ่งที่ไม่อุดมสมบูรณ์และมีอาหารสะสมน้อย

3) อายุของพืช พืชที่เป็นไม้เนื้อแข็งและเป็นชนิดที่ขยายพันธุ์ด้วยวิธีการที่ไม่เกี่ยวข้องกับการใช้เพศได้ค่อนข้างยาก ส่วนต้นหรือกิ่งที่ยังอ่อนอาจมีโอกาสที่จะทำการขยายพันธุ์

ด้วยวิธีการที่ไม่เกี่ยวข้องกับการใช้เพศได้หลายวิธี แต่อาจจะต้องใช้เทคนิคในการขยายพันธุ์ที่ละเอียดอ่อนกว่าปกติ และใช้การปฏิบัติดูแลที่พิเศษออกไปกว่าปกติ โดยทั่วไปกิ่งอ่อนจะใช้ขยายพันธุ์โดยวิธีการที่ไม่เกี่ยวข้องกับการใช้เพศได้ดีกว่ากิ่งแก่

**4) พันธุกรรมของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี** พันธุกรรมของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีที่นำมาทำการติดตา ต่อกิ่ง หรือทาบกิ่ง ควรเป็นพืชที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกัน หรือไม่แตกต่างกันมาก เช่น เป็นพืชที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกัน หรืออยู่ในสกุลเดียวกัน เพื่อให้การติดตา ต่อกิ่ง หรือทาบกิ่งประสบความสำเร็จ หรือเกิดความล้มเหลวน้อยที่สุด

#### 4.1.2 ปัจจัยภายนอก

**1) ฤดูกาล** โดยทั่วไปการขยายพันธุ์พืชในเขตร้อนโดยการติดตา ต่อกิ่ง ทาบกิ่ง หรือปักชำ นิยมทำกันในฤดูฝนซึ่งเป็นช่วงเวลาที่สภาพอากาศมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช

**2) อุณหภูมิและความชื้น** หลังจากการขยายพันธุ์พืชแบบติดตา ทาบกิ่ง ต่อยอด หรือปักชำ หากจัดให้สภาพแวดล้อมรอบๆ ต้น หรือกิ่งที่ขยายพันธุ์ได้รับอุณหภูมิและความชื้นสูงแล้วจะไปเร่งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อของส่วนขยายพันธุ์ทำให้การเชื่อมประสานของเนื้อเยื่อและการงอกรากเกิดขึ้นได้เร็ว

**3) โรคและแมลงศัตรู** ในการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ของกิ่งตัดชำ หรือส่วนของเนื้อเยื่อที่เชื่อมประสานกัน ของวิธีการทาบกิ่ง ต่อกิ่ง ติดตา เนื้อเยื่ออ่อนเหล่านี้ประกอบด้วยเซลล์ที่มีอายุน้อยยังไม่มี ความแข็งแรง ฉะนั้นโอกาสที่จะถูกรบกวนจากโรคแมลงย่อมเกิดขึ้นได้ง่าย และเนื้อเยื่อที่ไม่มี ความแข็งแรงเหล่านั้นมีจำนวนไม่มาก และอยู่ในช่วงที่มีความสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงที่จะสร้างเป็นเนื้อเยื่ออื่นที่จำเป็น ฉะนั้นหากมีการเข้าทำลายของโรคแมลง ความเสียหายจะเกิดขึ้นทันที

**4) ความชำนาญของผู้ปฏิบัติ** โดยเฉพาะกับการขยายพันธุ์พืชโดยวิธีติดตา ต่อกิ่ง ทาบกิ่ง เป็นต้น ซึ่งจะต้องฉีกเนื้อเยื่อให้เป็นแผล หรือเปิดเนื้อเยื่อออกผู้ที่ทำการขยายพันธุ์พืชดังกล่าวจะต้องฝึกจนชำนาญ มีความละเอียดอ่อนทุกขั้นตอนในการขยายพันธุ์จึงจะก่อให้เกิดความสำเร็จ

## 4.2 การขยายพันธุ์ยาง และการติดตามเขียว

ยางพาราสามารถทำการขยายพันธุ์ได้หลายวิธี เช่น การขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด (ไม่นิยมเนื่องจากเกิดการกลายพันธุ์) ใช้วิธีการติดตามเขียว ติดตามสีน้ำตาล เป็นต้น ซึ่งการขยายพันธุ์โดยวิธีการติดตาม จะแบ่งออกเป็นการติดตามเขียว และการติดตามสีน้ำตาล แต่ส่วนใหญ่นิยมขยายพันธุ์ด้วยการติดตามเขียวมากกว่า เพราะทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และมีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จในการติดตามสูงมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์

### 4.2.1 ปัจจัยสำคัญสำหรับการติดตามเขียว

การติดตามเขียวจะได้ผลสำเร็จสูงหรือไม่ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ที่สำคัญ ได้แก่

1) **ต้นกล้ายาง** จะต้องมีความสมบูรณ์แข็งแรง มีอายุประมาณ 4.5 ถึง 8 เดือน ขนาดของลำต้นมีเส้นผ่าศูนย์กลางไม่น้อยกว่า 1 เซนติเมตร วัดจากระดับความสูงจากพื้นดิน 10 เซนติเมตร มีลำต้นตั้งตรง โคนรากไม่คดงอ และลอกเปลือกได้ง่าย

2) **กิ่งตาเขียว** กิ่งที่ได้จากแปลงกิ่งตายาง ซึ่งได้รับการตรวจสอบแล้วว่าเป็นพันธุ์ยางพาราที่ถูกต้อง กิ่งตาเขียวที่สมบูรณ์จะต้องมีอายุ 42 ถึง 49 วัน ลอกเปลือกได้ง่าย ไม่เปราะหรือมีเสี้ยนติดเนื้อไม้

3) **ความชำนาญในการติดตาม** วิธีการติดตามเขียวสามารถฝึกหัดได้ง่าย ผู้ที่มีความชำนาญแล้วจะได้รับผลสำเร็จสูงกว่าร้อยละ 90 แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆด้วย โดยทั่วไปผู้ที่มีความชำนาญจะสามารถติดตามได้ประมาณ 300 ต้นต่อวัน

4) **ฤดูกาล** ควรเป็นต้นฤดูฝนไปจนถึงกลางฤดูฝน ส่วนปลายฤดูฝนไม่ควรทำการติดตามเพราะเมื่อตัดต้นเพื่อให้กิ่งตาผลิออกมา ก็จะเริ่มเข้าสู่ฤดูแล้ง ซึ่งจะทำให้ต้นยางพาราตายได้ แต่หากติดตามแล้วถอนนำไปชำไว้ในถุงพลาสติกก็สามารถปฏิบัติได้ และหากในแปลงกล้ายางมีการรดน้ำตลอดทุกวันก็จะสามารถติดตามได้ตลอดทั้งปี

5) **วัสดุอุปกรณ์** วัสดุอุปกรณ์ที่จำเป็นในการติดตาม ได้แก่

- กรรไกรตัดกิ่งตา
- ถุงพลาสติกใส่กิ่งตา
- แถบพลาสติกใส ขนาดกว้าง 5/8 นิ้วหนา 0.05 มิลลิเมตร
- หินลับมีด
- เศษผ้าสำหรับทำความสะอาดต้นยางพารา

#### 4.2.2 วิธีการติดตาเขียว

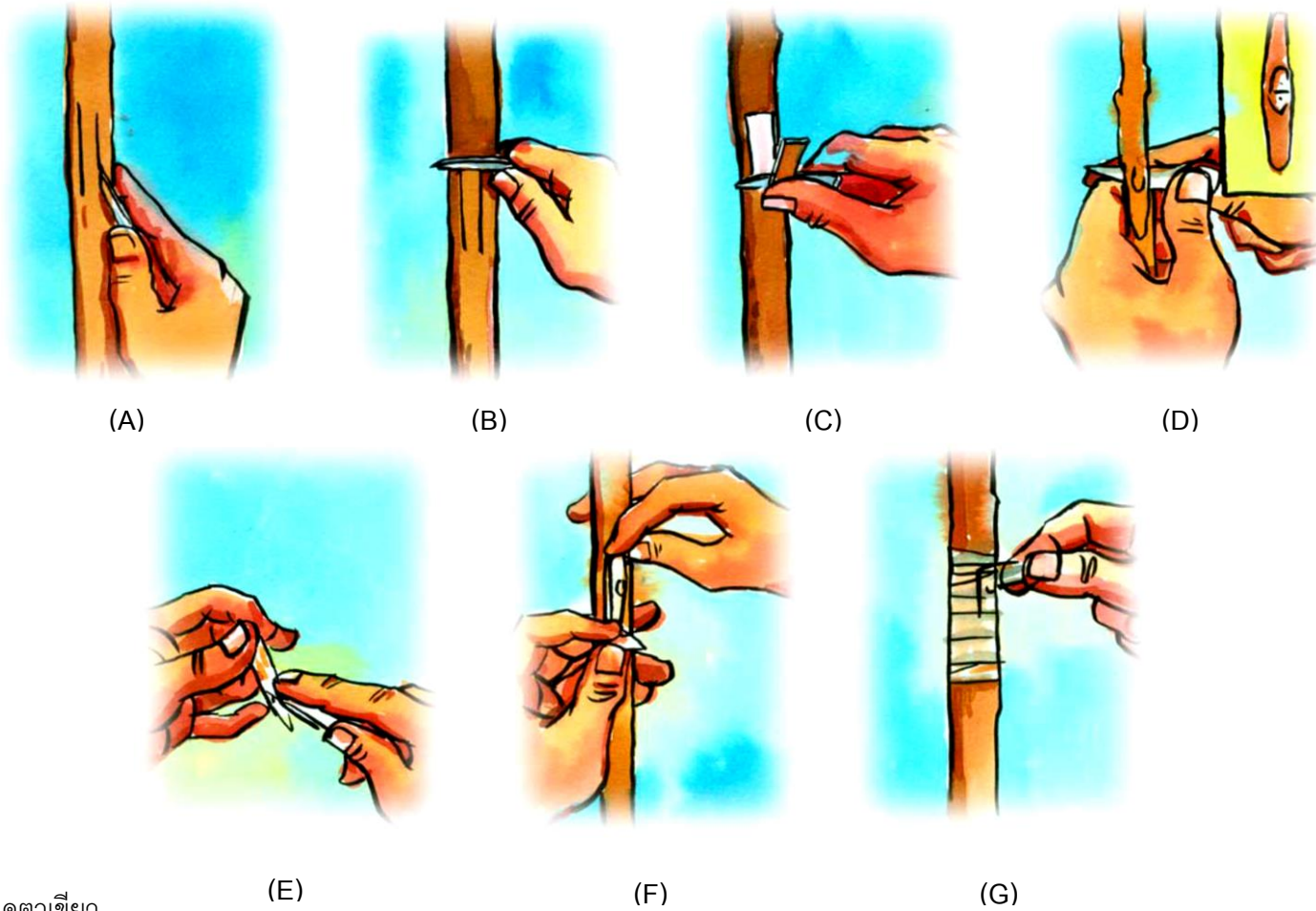
วิธีสำหรับการติดตาแบบการติดตาเขียวมีดังต่อไปนี้

- 1) เลือกต้นกล้าที่มีความสมบูรณ์ ทำความสะอาดโคนต้นกล้าด้วยเศษผ้า โดยการเช็ดล้าง สกปรก และทรายออกจากต้นกล้าวาง
- 2) เปิดรอยกรีดโดยใช้ปลายมีดกรีดตามความยาวลำต้น จำนวน 2 รอย ความยาว 7 ถึง 8 เซนติเมตร ห่างกันประมาณ 1 เซนติเมตร (รูปที่ 4A-C) ให้ส่วนล่างของรอยกรีดสูงจากพื้นดิน ประมาณ 1 ถึง 2 เซนติเมตร แล้วใช้มีดกรีดเป็นแนวขวางกับรอยกรีดโดยให้ด้านบนเชื่อมติดกัน แล้วใช้ปลายมีดหรือด้ามงาบแคะเปลือกบริเวณมุมแล้วลอกเปลือกลงข้างล่างจนสุด จากนั้นตัดเปลือกที่ดึงออกให้เหลือเป็นลักษณะของลิ้นสั้นๆ ความยาวประมาณ 1 ถึง 1.5 เซนติเมตร
- 3) เตรียมแผ่นตาที่ได้จากกิงตาเขียว (รูปที่ 4D) ใช้มีดคมเขือนออกอย่างเบามือ โดยเริ่มจากด้านปลายไปยังด้านโคนโดยให้ติดเนื้อไม้บางๆ อย่างสม่ำเสมอตลอดแนวยาว ความยาว ประมาณ 8 ถึง 9 เซนติเมตร และให้มีตาอยู่ตรงกลางแผ่น ความกว้างของแผ่นตาประมาณให้พอดีกับความกว้างของรอยแผล และเปิดเปลือกบนต้นกล้า หากเขือนแผ่นตาหนาเกินไปจะทำให้ ลอกออกยาก เนื่องจากแผ่นตาเขียวชำได้ง่าย ดังนั้นก่อนก่อนเขือนแผ่นตาต้องแน่ใจว่ามีดคม และ สะอาด
- 4) แต่งแผ่นตาทั้งสองข้างให้มีลักษณะบางๆ ให้แผ่นตาสามารถสอดเข้ากับรอยเปิดกรีด บนต้นตอ จากนั้นตัดปลายด้านล่างออก
- 5) ลอกแผ่นตาออกจากเนื้อไม้ โดยการใช้นิ้วชี้ และนิ้วหัวแม่มือทั้งสองข้างจับปลาย ด้านบนของแผ่นตา ใช้นิ้วกลางประคองแผ่นตาส่วนล่างแล้วค่อยๆ ลอกเนื้อไม้ออกจากเปลือกแผ่นตา โดยพยายามอย่าให้ส่วนที่เป็นเปลือกโค้งงอ หรืออีกวิธีหนึ่งคือ ใช้การลอกด้วยปากโดยใช้มือข้างหนึ่ง จับแผ่นตาไว้ แล้วหันด้านปลายแผ่นตาที่ยังไม่ตัดเข้าหาปาก ใช้ฟันยึดส่วนที่เป็นเนื้อไม้แล้วใช้นิ้วหัวแม่มือ กับนิ้วชี้ของมืออีกข้างหนึ่งจับเปลือกด้านล่างไว้ แล้วค่อยๆ ลอกเนื้อไม้ออกจากเปลือกแผ่นตา พยายามไม่ให้เปลือกโค้งงอเช่นกัน ตรวจสอบแผ่นตาที่ลอกเสร็จ หากแผ่นตาชำหรือจุดเยื่อเจริญหลุด แหว่งหรือไม่สมบูรณ์ให้ทิ้งไป ใช้เฉพาะแผ่นตาที่สมบูรณ์เท่านั้น (รูปที่ 4E)
- 6) สอดแผ่นตาที่ลอกเนื้อไม้ออกแล้วนี้ใส่ลงในลิ้นเปลือกต้นตอเบาๆ อย่างรวดเร็ว และ ในขณะที่ใส่ระวังอย่าให้แผ่นตาถูกเนื้อไม้ เพราะจะทำให้แผ่นตาและเยื่อราเกิดอาการชำได้ และตัด ส่วนของแผ่นตาที่เกินอยู่ข้างบนทิ้งหรือจะทิ้งไว้ เพื่อรอตัดออกในขณะที่พื้นผ้าพลาสติกก็ได้ (รูปที่ 4F)

7) พันแผ่นตาด้วยแผ่นพลาสติกใส ขนาดความยาวประมาณ 30 เซนติเมตร โดยพันจากด้านล่างขึ้นข้างบนให้แผ่นตาแนบกับแผลรอยเปิดของต้นกล้า และให้ขอบพลาสติกทับกันสูงขึ้นไปจนเหนือรอยตัดตา 2 ถึง 3 รอบ ผูกพลาสติกให้แน่นโดยการสอดปลายเข้าไปในพลาสติกรอบสุดท้ายแล้วดึงให้แน่น (รูปที่ 4G)

8) ตรวจสอบความเรียบร้อยพร้อมทั้งปักป้ายแสดงวันที่ติดตา ชื่อพันธุ์ยางพารา และจำนวนต้น หลังจากนั้นอีก 21 วัน ให้ตรวจดูความเจริญเติบโต หากแผ่นตายังคงมีสีเขียวแสดงว่าการติดตาประสบความสำเร็จให้ใช้มีดกรีดพลาสติกบริเวณด้านตรงข้ามเพื่อไม่ให้พลาสติกหลุดออกจากแผ่นตา แต่หากแผ่นตาเปลี่ยนเป็นสีดำหรือสีน้ำตาล แสดงว่าการติดตาไม่ประสบความสำเร็จ ให้ใช้มีดกรีดพลาสติกด้านหลังออกเพื่อทำการติดตาซ้ำหลังจากตรวจผลสำเร็จ และเมื่อนำพลาสติกออก ปล่อยให้ต้นที่ติดตาอยู่ในแปลงไม่น้อยกว่า 1 สัปดาห์ก่อนที่จะถอนไปปลูกหรือตัดต้นเดิมทิ้ง (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, 2545)





รูปที่ 4 ขั้นตอนการติดตาเขียว  
 ที่มา วัลลภ (2543)

## 5. ความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อ และปัจจัยที่มีผลต่อความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อ

ความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อ (compatibility) คือ ความสำเร็จในการเกิดรอยเชื่อมของเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนของพืช 2 ต้น ภายในพืช 1 ต้น เข้าด้วยกันเพื่อการผลิตต้นพืชที่มีความสมบูรณ์ และแข็งแรง (Hartmann *et al.*, 2010)

### 5.1 การเกิดรอยเชื่อมของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี

พิทักซ์ และสุภาลัย (2553) ได้อธิบายถึงการเกิดรอยต่อของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีว่า การเชื่อมกันของกิ่งพันธุ์ดี กับต้นตอเปรียบได้กับการสมานบาดแผล เมื่อมีการทาบกิ่ง ต่อกิ่ง และติดตา จะต้องประกบ และมัดชิ้นส่วนทั้งสองให้แน่น เซลล์บริเวณแคมเปียมของแผลจะสร้างเซลล์พาเรนาไคมาจำนวนมากเป็นแคลลัส (callus) และเปลี่ยนแปลงเป็นแคมเปียม ซึ่งต่อมาจะสร้างเป็นท่อน้ำ และท่ออาหาร โดยการสมานของรอยต่อระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีนั้น ชิ้นส่วนทั้งสองที่นำมาแนบสนิทกัน ไม่เคลื่อนที่ หรือเติบโตเข้าหากัน แต่เกิดจากเซลล์ที่เกิดขึ้นหลังการทาบกิ่ง ต่อกิ่ง และติดตา และในบริเวณรอยต่อ ไม่มีการคละกันระหว่างส่วนประกอบของเซลล์ เซลล์ที่เกิดจากกิ่งพันธุ์ดี และต้นตอ ต่างมีลักษณะจำเพาะของตนอยู่อย่างครบถ้วนซึ่ง ขั้นตอนการสมานรอยต่อมีดังนี้

1) บริเวณเนื้อเยื่อเจริญ (cambium region) ทั้งของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี จะสร้างเซลล์หรือแบ่งเซลล์มาประสานกันเพื่อเติมเต็มช่องว่างระหว่างรอยแผล โดยการสร้างกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า แคลลัส ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์พาเรนาไคมาที่เกิดบริเวณรอบๆ เนื้อเยื่อพืชที่เป็นแผล การประสานกันของเนื้อเยื่อแคลลัสเป็นขั้นตอนสำคัญในการสมานรอยต่อของกิ่งพันธุ์ดี และต้นตอ แต่ส่วนใหญุ่มักเกิดในต้นตอมากกว่า กลุ่มเซลล์นี้คือ พาเรนาไคมา (parenchyma) และจะทำหน้าที่คล้าย vascular bundle กลุ่มเซลล์นี้จะเกิด และปิดเต็มช่องว่าง ในระยะนี้ น้ำ และธาตุอาหารจากต้นตอสามารถจะเคลื่อนไปยังกิ่งพันธุ์ได้บ้างแล้ว หากมีกลุ่มเซลล์ที่เจริญล้นออกมาข้างนอกก็จะเปลี่ยนเป็นเปลือกของกิ่ง

2) การเกิดเนื้อเยื่อเจริญใหม่ ระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ ซึ่งเนื้อเยื่อเจริญใหม่นี้จะเชื่อมต่อกับเนื้อเยื่อเจริญเดิม

3) การเกิดท่อน้ำ (xylem) และท่ออาหาร (phloem) ขึ้นจากเนื้อเยื่อเจริญใหม่ หมายถึง การเกิดกลุ่มของท่อน้ำท่ออาหาร (vascular bundle) การเกิดขึ้นนี้จะต้องเกิดก่อนที่กิ่งพันธุ์ดีจะ

แตกตาเพื่อให้ต้นนั้นเกิดความสมบูรณ์ เนื่องจากพืชจะต้องมีระบบการส่งน้ำ และอาหารอย่างมีประสิทธิภาพก่อนแตกใบ มิฉะนั้นหากแตกใบก่อนจะทำให้อัตราการคายน้ำมีมากเกินไป ทำให้ต้นพืชตายได้

ในการติดตาการเกิดรอยเชื่อมของตานั้นจะเหมือนกับการทาบกิ่งทุกประการ ในทางธรรมชาติ หากเราทำบาดแผลขึ้นที่ต้นพืช แล้วฉีกบาดแผลนั้นจะเกิดกลุ่มเซลล์ที่เป็นแคลลัส มาเชื่อมสมานกัน และเซลล์ในกลุ่มนั้นจะกลายมาเป็นเนื้อเยื่อเจริญที่สร้างท่อลำเลียง และท่ออาหารขึ้น ลักษณะนี้เองที่ทำให้เกิดรอยเชื่อมขึ้นได้ กล่าวคือ ในการทาบกิ่ง เป็นการทาบรอยแผลของต้นพืช แล้วสอดส่วนของพืช (scion) ไว้ตรงกลางระหว่างรอยแผลนั้น

## 5.2 ความล้มเหลวของการเกิดรอยเชื่อมในการต่อกิ่ง

การนำพืชที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกันมาต่อกิ่งกันจะเกิดรอยเชื่อมต่อได้ง่ายตามปกติ แต่ถ้าเป็นพืชที่มีพันธุกรรมแตกต่างกันมากจะเกิดรอยเชื่อมต่อยาก ในบางครั้งพบว่าสามารถเกิดรอยเชื่อมต่อ แต่มักอยู่ไม่นานรอยต่อนั้นจะหลุดเมื่อพืชได้รับการกระทบกระเทือน เช่น ลมแรง และการหลุดออกนั้นจะหลุดตามรอยบาดแผลที่ทำไว้ ทำให้รอยที่ขาดออกจากกันนั้น เป็นรอยเรียบผิดจากรอยที่เกิดจากกิ่งไม้หัก ในบางกรณีแม้ว่ารอยเชื่อมต่อนั้นจะติดกันได้ แต่พบว่าต้นที่ได้จะไม่แข็งแรง แคระแกรน ยอดมีอาการเหลือง และในไม้ซ้ารอยเชื่อมนั้นก็หลุดออกจากกัน พัททช์ และสุภาลักษณ์ (2553) ได้อธิบายถึงประเภทของความล้มเหลวในการรอยเชื่อมของต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี ซึ่งจำแนกออกได้เป็น 2 แบบ คือ

1) **Translocated incompatibility** เกิดขึ้นเนื่องจากท่ออาหาร (phloem) ไม่สามารถจะพัฒนาจนสมบูรณ์ได้ เนื่องจากเกิดสาร HCN (hydrogen cyanide) ในพืชซึ่งพบได้ในแอปเปิ้ลเชอร์รี่ พืช มะม่วง มะนาว เป็นต้น (อมรรัตน์ และคณะ, 2550) สาร HCN ที่ผลิตขึ้นในกิ่งพันธุ์ดีและสารนี้เคลื่อนย้ายถึงกันได้ แคลลัสที่เกิดมักผิดปกติ อาการมักปรากฏมีรอยสีน้ำตาล และเกิดการเหลืองไหม้ที่เปลือกนอก เกิดการสะสมอาหารข้างบนมาก เนื่องจากไม่สามารถไหลลงมาข้างล่างได้ ดังนั้นส่วนล่างจึงขาดน้ำตาล หากเปลี่ยนเอากิ่งพันธุ์มาทำเป็นต้นตอ สามารถทำสำเร็จได้ในบางกรณี บางโอกาสจะพบว่ามีการแตกเต็มไปหมดรอบๆ รอยแผลที่เชื่อมต่อกิ่ง หากเกิดปรากฏการณ์เช่นนี้ แม้ว่าจะหากิ่งติดกลางต้น (interstock) มาเชื่อมต่อกิ่งก็มักไม่มีผลสำเร็จ เพราะสารที่ผลิตในกิ่งพันธุ์ดีไหลผ่านลงมาทำให้เกิดการไม่ติดระหว่างกิ่งตัวกลางกับต้นตอ สำหรับท่อลำเลียง (xylem) สามารถเจริญได้เป็นปกติ แต่ท่ออาหารสร้างไม่สำเร็จ แสดงว่าสารนี้กีดขวางทำให้เซลล์ของ

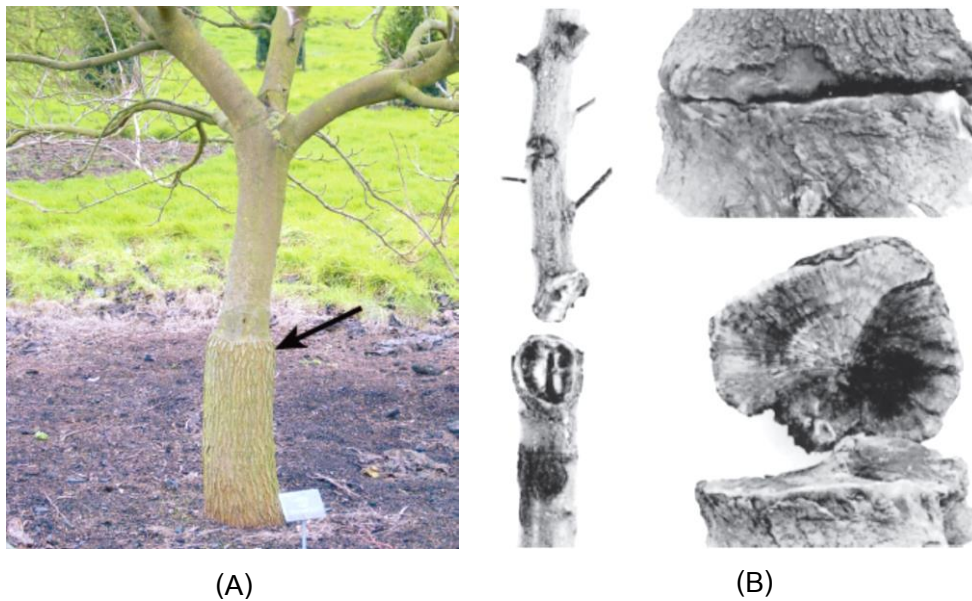
พืชทั้งสองสมานกันไม่ได้ การเข้ากันไม่ได้ในลักษณะนี้อาจมีสาเหตุมาจากการมีไวรัสในกิ่งพันธุ์ หรือ ต้นตอ

2) **Localized incompatibility** การที่รอยต่อระหว่างกิ่งพันธุ์กับต้นตอไม่เชื่อมกันแน่น เนื่องจากการเกิดเนื้อเยื่อของกลุ่มท่อน้ำท่ออาหารนั้นไม่สมบูรณ์ โดยเชื่อมกับของเดิมได้ไม่ดีนัก ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะทางเนื้อเยื่อของพืชทั้งสองแตกต่างกันมากจึงสมานเข้ากันได้ยาก จึงทำให้ การลำเลียงน้ำ และธาตุอาหารไม่สะดวก ทำให้ต้นที่ได้อ่อนแอ รากขาดอาหาร หากรอยต่อถูก กระแทบกระเทือนมากๆ รอยต่อจะหลุด เช่น ลมแรงจะทำให้รอยต่อหลุด

### 5.3 อาการแสดงลักษณะของความล้มเหลวของการเกิดรอยเชื่อม

พืชที่ทำการทาบกิ่งหรือติดตาหากเกิดความล้มเหลวในการเกิดรอยเชื่อมระหว่าง กิ่งพันธุ์กับต้นตอ แสดงว่ารอยต่อนั้นไม่แข็งแรง อาจหลุดได้ง่าย ซึ่งจะสังเกตเห็นพืชมีอาการ ดังต่อไปนี้ (อาการดังกล่าวเรียงตามลำดับความรุนแรง)

- 1) อัตราการเจริญของต้นตอกับกิ่งพันธุ์ที่ติดกันนั้นแตกต่างกันมาก (รูปที่ 5A)
- 2) กิ่งสองกิ่งนั้นไม่ติดกันเลย (รูปที่ 5B)
- 3) แม้ว่ารอยเชื่อมต่อจะติดกันแล้ว แต่ในฤดูกาลเจริญเติบโตในปีต่อมา ใบของต้นพืชใหม่จะ เหลือง ใบร่วงเร็ว แตกใบอ่อนน้อย และมีบางกิ่งในลำต้นเหลืองตาย
- 4) ต้นใหม่ที่ได้อายุสั้น จะตายไปภายใน 1-2 ปี
- 5) พบความแตกต่างของกิ่งพันธุ์ และต้นตอในตอนต้น และปลายฤดูกาลเจริญเติบโต
- 6) เกิดจากการเจริญเติบโตอย่างผิดปกติที่เหนือหรือใต้รอยต่อ (พิทักษ์ และสุภาลัย, 2553)



- รูปที่ 5** ตัวอย่างลักษณะอาการผิดปกติของพืชเนื่องจากความล้มเหลวของการเกิดรอยเชื่อม
- (A) อัตราการเจริญของต้นตอกกับกิ่งพันธุ์ที่ติดกันนั้นแตกต่างกัน (ลูกศรสีดำ แสดงบริเวณรอยเชื่อมของต้นตอก และกิ่งพันธุ์ที่มีอัตราการเจริญแตกต่างกัน)
- (B) กิ่งสองกิ่งนั้นไม่ติดกัน

ที่มา Hartmann และคณะ (2010)

#### 5.4 การตรวจสอบความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ในช่วงระยะตอนต้น

การตรวจสอบความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อพืช สามารถทำได้หลายวิธีดังนี้

##### 1) การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การตรวจสอบถึงความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อส่วนใหญ่มักจะพบเมื่อเวลาผ่านไปหลายปีภายในแปลงปลูก แต่ปัจจุบันสามารถระบุได้ในช่วงต้นของการเกิดความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อในหลอดทดลอง (*In vitro techniques*) โดยการศึกษาผ่านการรวมกันของแคลลัสเซลล์ (*callus fusion techniques*) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Jonard *et al.*, 1990; Errea *et al.*, 2001) โดยความสำเร็จในการเชื่อมต่อกันของเนื้อเยื่อนั้นอาจเกี่ยวข้องกับหลายกระบวนการ และในขั้นแรกของการเกิดความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อ คือ การเกิดกระบวนการจดจำกันของระหว่างเซลล์ (Pina

และ Errea, 2005) เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสเซลล์เพื่อไปทำหน้าที่ต่างๆ จะเกิดขึ้นหลังจากที่เซลล์เริ่มมีการจดจำกันของระหว่างเซลล์ (Considine, 1983) หลังจากนั้นแคลลัสเซลล์จะเริ่มมีการเชื่อมต่อกันในเนื้อเยื่อที่เข้ากันได้ และจะเกิดการตายของเซลล์ในเนื้อเยื่อที่เข้ากันไม่ได้ การศึกษาความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อแคลลัสในแอปริคอต (*Prunus armeniaca*) โดยการวางเลี้ยงชิ้นส่วนของลำต้นกิ่งพันธุ์ดี และต้นตอแต่ละสายพันธุ์ ขนาด 0.5 เซนติเมตร ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อบนอาหาร MS ที่มีองค์ประกอบของสารอาหารที่เหมาะสมกับการพัฒนาของแคลลัส ตรวจสอบการเชื่อมต่อกันของเนื้อเยื่อแคลลัสจากชิ้นส่วนแคลลัส 2 ชิ้น, การพัฒนาของเซลล์บริเวณที่มีการสัมผัสกันของเนื้อเยื่อแคลลัสทั้ง 2 ชิ้น (Errea *et al.*, 2001) และการศึกษาปริมาณสารจำพวกไขมัน และปริมาณสาร ฟีนอลิกที่ขึ้นส่วนของแคลลัสสร้างขึ้นในช่วง 3 สัปดาห์แรกหลังจากเกิดการเข้ากัน และไม่เข้ากันของเนื้อเยื่อแคลลัส การศึกษาความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อแคลลัสใน *Uapaca kirkiana* Muell Arg. (Simon *et al.*, 2008) ที่มีถิ่นกำเนิด และสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน โดยการใช้ชิ้นส่วนใบ ของ *U. kirkiana* Muell Arg. วางเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีองค์ประกอบของสารอาหาร และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการชักนำให้ชิ้นส่วนใบเกิดการพัฒนามันเป็นแคลลัส ทำการตรวจสอบการตายของเนื้อเยื่อแคลลัสเซลล์บริเวณที่มีการเชื่อมต่อกันของแคลลัสเซลล์ และตรวจสอบการเกิดสารฟีนอลิกบริเวณที่เกิดความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อ และไม่เข้ากันของเนื้อเยื่อซึ่งเป็นบริเวณที่เนื้อเยื่อแคลลัสเซลล์ตาย

## 2) การตรวจสอบทางเนื้อเยื่อวิทยา

การตรวจสอบเนื้อเยื่อวิทยา (histological studies) สามารถใช้ในการจำแนกและศึกษาถึงความแตกต่างระหว่างเนื้อเยื่อที่สามารถเชื่อมต่อกันได้สำเร็จ กับเนื้อเยื่อที่ไม่สามารถประสานกันได้โดยดูจากลักษณะอาการทั่วไป ในกรณีที่เกิดความล้มเหลวในการเกิดรอยเชื่อมได้แก่ ส่วนของเปลือกไม่เชื่อมต่อกัน ซึ่งเป็นลักษณะหลักที่จะแสดงให้เห็นถึงการทำหน้าที่ผิดปกติของแคมเปียม และการสะสมของแป้งในส่วนของกิ่งพันธุ์ดี (Ernel *et al.*, 1998) เทคนิคการตรวจสอบทางเนื้อเยื่อวิทยาใช้สำหรับการศึกษาความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อของการเชื่อมประสานกันระหว่างกิ่งพันธุ์ดี และต้นตอ รวมไปถึงการหาสาเหตุที่เป็นไปได้ของการเกิดความล้มเหลวในการเชื่อมประสานกันของเนื้อเยื่อ ซึ่งได้มีการศึกษาความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อใน *U. kirkiana* Muell Arg. (Simon *et al.*, 2008) โดยการประเมินเส้นผ่านศูนย์กลางของกิ่งพันธุ์ดี, ต้นตอ และบริเวณที่เชื่อมประสานกันของเนื้อเยื่อของ *U. kirkiana* Muell Arg. การตัดตามขวางของลำต้นบริเวณที่เกิดรอยเชื่อมแล้วนำมาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และดูการสะสมของฟีนอลิก

บริเวณรอยเชื่อมทั้งในเนื้อเยื่อที่เข้ากันได้ และเนื้อเยื่อที่เข้ากันไม่ได้ การศึกษาความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อด้วยการตรวจสอบทางเนื้อเยื่อวิทยาในต้นแพร์/ คิวินซ์ หลังจากการทาบกิ่งไปแล้ว 5 เดือน (Emel *et al.*, 1998) เพื่อศึกษาลักษณะของความล้มเหลวในการเกิดรอยเชื่อมจากการทาบกิ่ง

### 3) การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์

แบบแผนไอโซไซม์ (isozyme analyses) สามารถนำมาใช้ในการประเมินความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อได้ (Santamou, 1983) โดยการใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟริซิส เพื่อแยกความแตกต่างของแถบเอ็นไซม์เพอร์ออกซิเดส (peroxidase) จากบริเวณเนื้อเยื่อของกิ่งพันธุ์ดี และต้นตอมาเปรียบเทียบกัน ซึ่งเอ็นไซม์เพอร์ออกซิเดสมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดสารจำพวกลิกนิน (lignification) โดยลิกนินนั้นเป็นส่วนประกอบของเซลล์พาราไคมาที่สะสม และทำหน้าที่ในการช่วยลำเลียงธาตุอาหารในต้นพืช ลิกนินที่สะสมในผนังเซลล์จะช่วยเสริมความแข็งแรงของรอยต่อระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี และการสร้างเนื้อเยื่อเจริญเมื่อเกิดบาดแผล (พวงผกา, 2548) Buchloh (1960) รายงานว่ากระบวนการเกิดลิกนินเป็นกระบวนการที่จำเป็นสำหรับกลไกการเกิดรอยเชื่อมต่อกันระหว่างกิ่งพันธุ์ดี และต้นตอที่แข็งแรง นำไปสู่ความสำเร็จในการเกิดรอยเชื่อมตามธรรมชาติ Harkin และ Obst (1973) ได้รายงานไว้ว่า กระบวนการเกิดสารจำพวกลิกนินนั้นถูกควบคุมโดยเอ็นไซม์เพอร์ออกซิเดส ซึ่งสอดคล้องกับ Santamou และคณะ (1986) รายงานว่าลักษณะที่ปรากฏของแถบไอโซไซม์จากต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีที่มีความคล้ายคลึงกัน บ่งบอกถึงความสามารถในการเข้ากันได้ของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี โดยที่กิ่งที่เข้ากันได้จะมีเนื้อเยื่อเจริญจำนวนมากล้อมรอบบริเวณรอยต่อ และสามารถสร้างท่อลำเลียงเชื่อมต่อกันได้อย่างต่อเนื่อง หากพบว่า ไอโซไซม์มีความแตกต่างกัน จะทำให้เกิดการสร้างแคลลัสเพียงเล็กน้อยที่บริเวณรอยเชื่อม ต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีจะไม่สามารถสร้างท่อลำเลียงเชื่อมต่อกันได้

### 4) การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอล

การวิเคราะห์ฟีนอล (phenol analyses) เป็นที่น่าสนใจโดยเฉพาะอย่างยิ่ง บทบาททางสรีรวิทยาในขั้นตอนแรกของการเกิดรอยเชื่อม เนื่องจากสารประกอบฟีนอลมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการของการแบ่งเซลล์, การพัฒนาของเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อใหม่ (Errea, 1998) ใน แอปริคอตการสะสมของสารประกอบฟีนอลบางชนิดจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับปัญหาในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อใหม่ของแคลลัส (Errea *et al.*, 1994) Usenik และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาผลของความสำเร็จในการเกิดรอยเชื่อมจากการทาบกิ่ง

ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในต้นแอปเปิลโดยการใช้เทคนิค HPLC ในการวิเคราะห์ และจำแนกชนิดของสารประกอบฟีนอลิก พบว่า Phloroglucinol, Catechin, *p*-Coumaric และสารจำพวกฟีนอลที่ไม่สามารถจัดจำแนกชนิดได้มีผลอย่างจำเพาะเจาะจงต่อความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อ

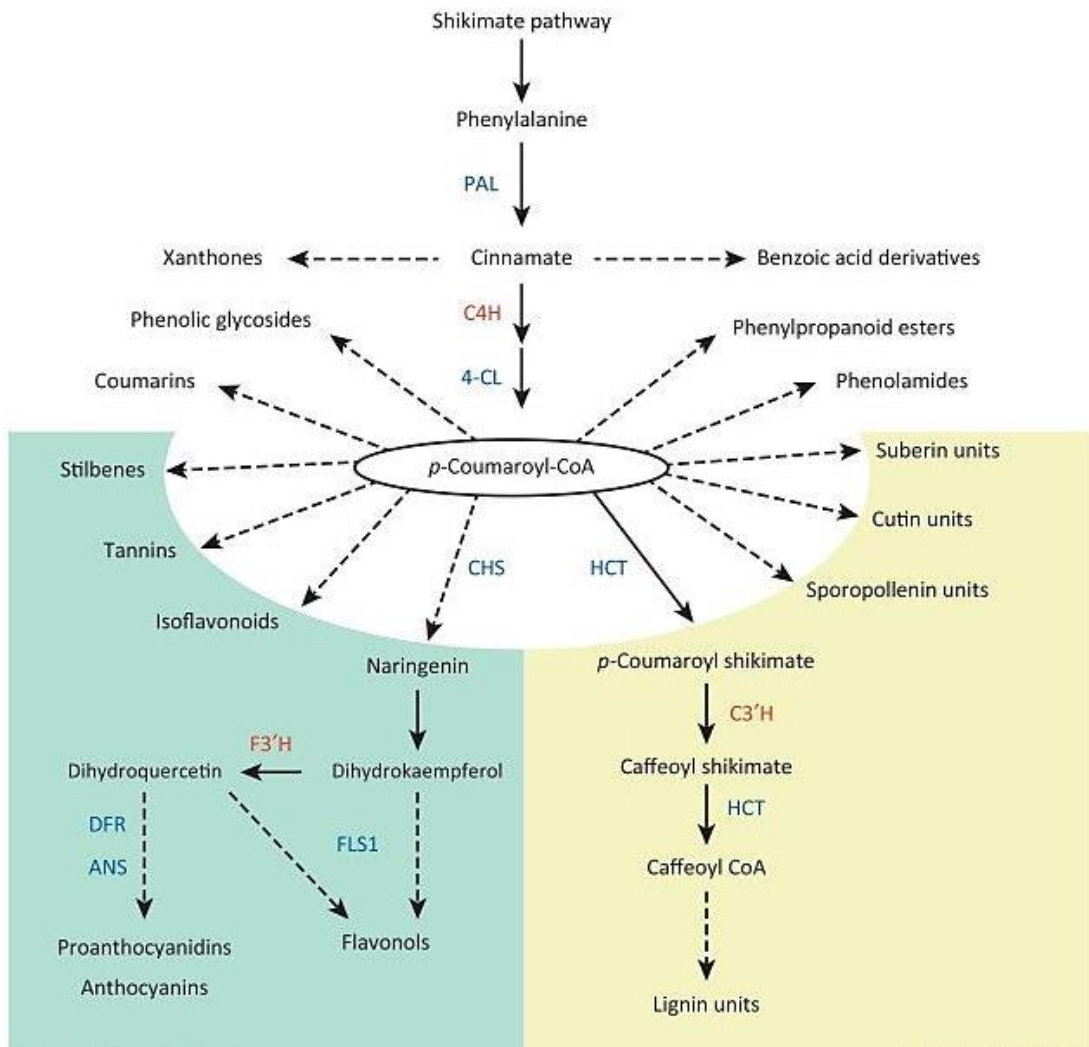
#### 5) การศึกษาการแสดงออกของยีน

โดยการศึกษายีนที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อ ได้แก่ ยีน *Phenylalanine ammonia lyase (PAL)* ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase ในวิถีของ phenylpropanoid โดยเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase จะถูกกระตุ้นที่ระดับ transcriptional ในการตอบสนองต่อความเครียดต่างๆ เช่น การเข้าทำลายของโรค, รังสี UV, ระดับของไนโตรเจน ฟอสเฟต หรือไอรอนต่ำ, รวมไปถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างต้นตอ/กิ่งพันธุ์ดี (Dixon และ Paiva, 1995; Kubota *et al.*, 2001; Leng และ Qui, 2003; Olsen *et al.*, 2008; Pina และ Errea, 2008; Sullivan *et al.*, 2009) พบระดับ transcription ของยีน *PAL* ค่อนข้างสูงจากความล้มเหลวในการเกิดรอยเชื่อมของแอปเปิล/พลัม ที่ส่งผลให้มีการสะสมของสารประกอบฟีนอลิกที่สูง (Pina และ Errea, 2008) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลของความแตกต่างของต้นตอ/กิ่งพันธุ์ดี ในพืชตระกูลพรวนหลังจากการทาบกิ่ง 2-3 ปี ต่อลักษณะการเจริญเติบโตหลายๆ แบบ ที่เกี่ยวข้องกับ การแสดงออกของยีน และกิจกรรมของเอนไซม์ *PAL* ที่มีบทบาทต่อความล้มเหลวในการเกิดรอยเชื่อม โดยยีน *PAL1* และยีน *PAL2* มีการแสดงออกของยีนที่สูง ทั้งยังส่งผลให้เอนไซม์ *PAL* มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงในพรวนที่เกิดความล้มเหลวในการเกิดรอยเชื่อม ซึ่งแสดงอาการการเจริญเติบโตที่ผิดปกติตรงบริเวณที่เกิดรอยเชื่อม (Dos Santos Pereira *et al.*, 2014)

#### 6. ยีน *phenylalanine ammonia lyase (PAL)*

ยีน *Phenylalanine ammonia lyase (PAL)* เป็นยีนตัวแรกในวิถีของ phenylpropanoid ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase ที่ทำหน้าที่ในการสร้างสารทุติยภูมิ ได้แก่ แอนโทไซยานิน, ฟลาโวนอยด์ และลิกนิน (รูปที่ 6) โดยยีน *PAL* จะถูกกระตุ้นจากความเครียดต่างๆ เช่น การเข้าทำลายของโรค, รังสี UV, ระดับของไนโตรเจน ฟอสเฟต หรือไอรอนต่ำ, รวมไปถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างต้นตอ/กิ่งพันธุ์ดี (Dixon และ Paiva, 1995; Kubota *et al.*, 2001; Leng และ Qui, 2003; Olsen *et al.*, 2008; Pina และ Errea, 2008; Sullivan *et al.*, 2009)





รูปที่ 6 วิธีของ phenylpropanoid ในการสร้างสารทุติยภูมิต่างๆ  
ที่มา Laursen และคณะ (2015)

## 7. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และการแสดงออกของยีน *phenylalanine ammonia lyase (PAL)* ต่อความเข้ากันได้ของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีในพืช

ฟีนอล (phenols), แทนนิน (tannins), ลิกนิน (lignins), กรดฟีนอลิก (phenolic acids) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) คือสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งเป็นสารประกอบทุติยภูมิมีหน้าที่ และบทบาทที่สำคัญต่อกิจกรรมของเอนไซม์ การเจริญเติบโตของพืช คุณภาพของผล และความล้มเหลวของการเกิดรอยเชื่อมในการต่อกิ่ง ทาบกิ่ง และการติดตาในพืช ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกเหล่านี้จะพบในส่วนของราก, ยอด, ดอก, ส่วนของเนื้อไม้, ใบ, ท่ออาหาร และส่วนละอองเรณูของต้นพืช โดยยีน *PAL* จะมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก (Evrenosoglu *et al.*, 2010)

Simon และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาการเกิดรอยเชื่อมของการต่อกิ่งในต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีของ *U. kirkiana* Muell Arg. ซึ่งเป็นพืชตระกูลเดียวกับยางพารา โดยการประเมินผลทางเนื้อเยื่อวิทยาในระยะเริ่มต้นของการเกิดรอยเชื่อมพบว่า ต้น *U. kirkiana* Muell Arg. มีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติบริเวณที่เกิดรอยเชื่อม, มีการตายของเนื้อเยื่อ และมีการสะสมของสารประกอบฟีนอลิกบริเวณผิวที่เกิดรอยเชื่อม ซึ่งส่งผลให้เกิดความล้มเหลวในการทาบกิ่ง นอกจากนี้ Hudina และคณะ (2014) ได้ทำการศึกษาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก และกระบวนการที่เกี่ยวข้องต่อความล้มเหลวในการเกิดรอยเชื่อมของการติดตาในต้นตอของแพร้พันธุ์ต่างๆ พบว่าต้นตอพันธุ์ Fox 11 กับกิ่งพันธุ์ 'Williams' มีการสร้างสารประกอบฟีนอลิกในโฟลเอมมากที่สุด ซึ่งส่งผลต่ออัตราการรอดตายของต้นแพร้ และทำให้เกิดความล้มเหลวในการเกิดรอยเชื่อมของต้นแพร้พันธุ์ 'Williams' บนต้นตอ Fox 11 ส่งผลให้ในส่วนของท่อน้ำ ท่ออาหาร และเนื้อไม้ไม่เชื่อมต่อกัน Dos Santos Pereira และคณะ (2014) ได้ทำการศึกษาผลของความเข้ากันได้ของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีที่แตกต่างกัน ต่อการเจริญเติบโตของพืชในตระกูลพรวน การแสดงออกของยีน *PAL* และกิจกรรมของเอนไซม์ *phenylalanine ammonia-lyase* พบว่าบริเวณที่เชื่อมต่อกันของกิ่งพันธุ์ดี Chimarrita กับต้นตอ Umezeiro มีขนาดของลำต้นที่ใหญ่ผิดปกติ อัตราการรอดตายของต้นตอกับกิ่งพันธุ์ดีอยู่ที่ 90% ส่วนการแสดงออกของยีน *PAL* และกิจกรรมของเอนไซม์ในกิ่งพันธุ์ดี Chimarrita กับต้นตอ Umezeiro สูงที่สุด ซึ่งจะเห็นได้ว่าความล้มเหลวของการเกิดรอยเชื่อมในการติดตา ต่อกิ่ง และทาบกิ่ง สัมพันธ์กับปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก การแสดงออกของยีน *PAL* และกิจกรรมของเอนไซม์ *phenylalanine ammonia-lyase* ในระดับที่สูง

## 8. เทคนิค Rapid Amplification cDNA Ends (RACE)

Rapid Amplification cDNA Ends (RACE) คือ เป็นวิธีการในการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ เพื่อโคลนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์จากบางส่วนของ cDNA ที่ทราบลำดับเบส เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณปลาย 5' และปลาย 3' ของ mRNA อาจเรียกว่า anchored PCR 3' และ 5' RACE วิธีการทำ RACE จะเติม poly A โดยการใส่เอนไซม์ terminal deoxytransferase (TDT) หรือโดยการเชื่อม oligonucleotide adaptor เข้าไปที่ปลาย 3' ของ cDNA และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนเป้าหมาย และ adaptor เพื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งอาจได้ปลาย 5' ที่ไม่สมบูรณ์ เนื่องจากอาร์เอ็นเอเริ่มแรกไม่สมบูรณ์ อย่างไรก็ตามเทคนิค RACE เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับใช้กับยีนที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงสั้นๆ ที่อยู่ในส่วนกลางของสาย mRNA ได้ (กรกช, 2558; ปุณยาพร, 2555)

## 9. เทคนิค quantitative Real time PCR

เป็นเทคนิคที่มีการพัฒนามาจากเทคนิค PCR ซึ่งเกิดจากการพัฒนาเทคโนโลยี 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือ การพัฒนาเทคโนโลยีในการตรวจหา PCR products ในสารละลายโดยใช้สารเรืองแสง (fluorescence reporters) ต่าง ๆ และการพัฒนาเครื่อง thermocycler ซึ่งแต่เดิมเป็นแค่เครื่องควบคุมอุณหภูมิขึ้นลงตามระยะเวลาที่กำหนด มาเป็นเครื่อง real time thermocycler โดยเพิ่มส่วนที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงเพื่อไปก่อให้เกิดการเรืองแสงของ PCR products และส่วนตรวจวัดการเรืองแสงที่เกิดจาก PCR product ในหลอดปฏิกิริยา การทำ real time PCR จึงเป็นการทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ โดยที่เราสามารถตรวจวัดปริมาณ PCR products ที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้น ๆ (วีระพงศ์, 2551) ซึ่งต่างจาก PCR แบบดั้งเดิม โดยการตรวจจะทำหลังจากปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสิ้นสุดลงแล้ว ปัจจุบันมีการนำเทคนิค real time PCR มาใช้วิเคราะห์การแสดงออกของยีนอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นวิธีการที่สะดวก และไม่ยุ่งยาก มีความไวในการตรวจวัด มีความถูกต้องแม่นยำ และมีความสามารถในการทำซ้ำสูง (ปุณยาพร, 2555) สำหรับเทคนิค real time PCR สามารถตรวจวัด PCR product ได้โดยการเกิดสัญญาณเรืองแสงของ PCR product ซึ่งมีอยู่ด้วยกัน 4 วิธี คือ

### 1) การใช้ SYBR Green I Dye

SYBR Green I เป็นสารเรืองแสง (fluorochrome) ที่สามารถเข้าจับกับ minor groove ของดีเอ็นเอสายคู่ เมื่อ SYBR Green I เกาะกับดีเอ็นเอสายคู่ และถูกกระตุ้น (excite) ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต จะมีการคายพลังงาน (emission) ออกมาในรูปของแสงในช่วงคลื่นยาวขึ้น สามารถ

ตรวจวัดได้ด้วยตัวรับสัญญาณแสงที่ติดตั้งอยู่กับเครื่อง real time Thermocycler (วีระพงศ์, 2551) ซึ่งการจับของ SYBR Green I กับดีเอ็นเอสายคู่ เป็นแบบไม่จำเพาะ (อโณทัย, 2549)

2) การใช้ probes ติดตามการสังเคราะห์ fluorochrome โดยอาศัยเทคโนโลยีของ Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

ในกรณีที่ต้องการความจำเพาะสูงสุด เช่น การบ่งชี้ single nucleotide mutations ในดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยนำ Fluorochrome 2 ประเภทติดตามเข้ากับสายของ specific Probe เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงพลังงานสูง Fluorochrome ตัวแรกที่เราจะเรียกว่า Quencher จะดูดซับพลังงานเอาไว้ และถ่ายทอดพลังงานให้ Fluorochrome ตัวที่สองที่เรียกว่า Reporter dye โดยไม่สูญเสียพลังงานออกสู่ระบบภายนอก เมื่อ reporter molecule ได้รับพลังงานจาก Quencher จะปลดปล่อยพลังงานออกสู่ระบบภายนอกในรูปของแสง ซึ่งเราสามารถตรวจวัดได้ ปฏิกริยาดังกล่าวเรียกว่า Fluorescent Resonance Energy Transfer (FRET) โดย probe ที่ใช้มีหลายชนิด ได้แก่ hybridization probe, hydrolysis Probe (Taqman) และ molecular Beacons (วีระพงศ์, 2551)

## 9.1 ลักษณะการใช้งาน Real-time PCR

แบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะใหญ่ๆ ดังนี้

1) การใช้งานในเชิงวิเคราะห์ปริมาณ (quantification analysis)

มีพื้นฐานที่การวัด fluorescence ของตัวเปล่งแสง (fluorophore) ในปฏิกริยาในเชิงปริมาณ เราจะสามารถมองเห็นการเพิ่มของ product ได้ในขณะที่มีการเพิ่มจำนวนในทุกรอบระหว่าง PCR (รูป S shape ของสัญญาณจะค่อยๆ ปรากฏเพิ่มขึ้นตามจำนวนรอบที่ทำ) และการวิเคราะห์การวัด fluorescence ในแต่ละรอบในช่วงเวลาหนึ่งๆ ทำโดยใช้คอมพิวเตอร์ทั้งหมด สัญญาณในช่วง exponential phase จะสัมพันธ์กับปริมาณตั้งต้นของ target template (อโณทัย, 2549) การใช้งานในเชิงวิเคราะห์ปริมาณด้วย real time PCR มี 2 วิธี คือ

- การวัดปริมาณแบบสัมพัทธ์ (relative quantification) เป็นการหาปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ต่างกันระหว่าง 2 ตัวอย่างโดยการเปรียบเทียบจากค่า threshold cycle ( $C_T$ ) ซึ่งจะได้ออกมาเป็นจำนวนเท่า (fold change) จำเป็นต้องมีตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (calibrator) โดยนำค่า  $C_T$  ของยีนที่เป็น reference gene (house keeping gene) เช่น actin, GAPDH หรือ 18s rRNA เป็นต้น มาใช้เป็นค่าอ้างอิงในการเปรียบเทียบจำนวนเท่าในการแสดงออก

ของยีน (expression level) จะคำนวณได้จากวิธี  $\Delta/\Delta C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$  method) ตามวิธีการของ Livak และ Schmittgen, (2001) จากสมการ

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-[(C_T \text{ sample} - C_T \text{ house keeping gene}) - (C_T \text{ calibrator} - C_T \text{ house keeping gene})]}$$

- การวัดปริมาณแบบสัมบูรณ์ (absolute quantification) ทำโดยการนำดีเอ็นเอ เริ่มต้นที่ทราบปริมาณแน่นอนแล้ว ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มาวิเคราะห์หาค่า  $C_T$  แล้วนำมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานระหว่างค่า  $\log$  ของดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ทราบความเข้มข้นกับค่า  $C_T$  ของค่าความเข้มข้นนั้นมาวิเคราะห์ด้วยสมการถดถอย (linear regression analysis) จากนั้นสามารถนำค่า  $C_T$  ของตัวอย่างที่ยังไม่ทราบค่าความเข้มข้นมาคำนวณตามสมการถดถอย (บุญยาพร, 2555)

### วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *PAL* และปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกต่อความสามารถในการเข้ากันได้ของต้นตอยางพาราพันธุ์พื้นเมือง และกิ่งพันธุ์ดี RRIM 600 และ RRIT 251

## บทที่ 2 วิธีการวิจัย

### วัสดุและอุปกรณ์

#### 1. วัสดุพืช

พืชที่ทำการศึกษแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นต้นตอ (rootstock) และส่วนที่เป็นกิ่งพันธุ์ดี (scion) ดังแสดงในรูปที่ 7 และตารางที่ 1 โดยทำการติดตาระหว่างต้นตออย่างพาราพันธุ์ต่างๆ กับกิ่งต่าพันธุ์ดี RRIM 600 และ RRIT 251 ในต้นตอที่มีอายุประมาณ 8-10 เดือน ขนาดของลำต้นต้องมีเส้นผ่านศูนย์กลางไม่น้อยกว่า 1 เซนติเมตร วัดจากระดับความสูงจากพื้นดิน 10 เซนติเมตร มีลำต้นตั้งตรง และโคนรากไม่คดงอ (รูปที่ 7) ซึ่งพันธุ์ของยางพาราที่ทำการทดลองและแหล่งที่มาแสดงในตารางที่ 1



RRIM 600

RRIT 251

ควนมดแดง

รูปที่ 7 ตัวอย่างการเจริญเติบโตของต้นตออย่างพาราในแปลงทดลองเพื่อใช้สำหรับการติดตาม

## ตารางที่ 1 พันธุ์ของยางพาราที่ทำการทดลอง และแหล่งที่มาของยางพารา

clone	พื้นที่ในการเก็บเมล็ดยางพารา
<b>กิ่งพันธุ์ดี (scion)</b>	
RRIM 600	บ้านหุแระ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา
RRIT 251	บ้านหุแระ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา
<b>ต้นตอ (rootstock)</b>	
RRIM 623	ต.คองหงส์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา (ข้างโลตัสหาดใหญ่)
บางรัก	ต.บางรัก อ.เมือง จ.ตรัง
ควนมดแดง	ม.สงขลานครินทร์ ว.หาดใหญ่ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา

## 2. สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์สำหรับการโคลนนิ่ง PAL

### 2.1 เชื้อแบคทีเรียเซลล์เจ้าบ้าน

เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 alpha สำหรับเพิ่มปริมาณของพลาสมิดลูกผสม

### 2.2 พลาสมิดสำหรับการโคลนนิ่ง PAL

พลาสมิด RBC TA cloning vector (RBC Bioscience, ใต้หวัน) ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ T7 ควบคุมการแสดงออกของยีน *LacZ* และต้านทานต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน มีตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ Multiple cloning region ดังแสดงในภาคผนวกรูปที่ 1

## 2.4 สารเคมีที่ใช้ในการโคลนยีน PAL

- 1) *Taq* DNA polymerase (New England Biolabs, USA)
- 2) Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 3) Agarose gel (EMD Millipore, USA)
- 4) 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 5) Ethidium bromide (Bio-Rad, USA)
- 6) Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 7) Deoxynucleotide (dNTP) Solution Set (New England Biolabs, USA)
- 8) Diethylpyrocarbonate (DEPC) (Panreac AppliChem, Spain)
- 9) E.Z.N.A.<sup>®</sup> Gel Extraction Kit (Omega Bio-tek, USA)
- 10) ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน
- 11) อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani broth (LB broth) (Becton, USA)
- 12) อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani agar (LB agar) (Becton, USA)

## 2.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการโคลนยีน PAL

- 1) Pipettes P2, P20, P200, P1000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 2) Pipettes tips (Greinerbio-one, Austria)
- 3) หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml (Sorenson BioScience, USA)
- 4) หลอด microcentrifuge ขนาด 500  $\mu$ l (Sorenson BioScience, USA)
- 5) หลอด PCR ขนาด 200  $\mu$ l (Sorenson BioScience, USA)
- 6) เครื่อง centrifuge 4 องศาเซลเซียส (Hettich, Germany)
- 7) Gel Doc<sup>™</sup> EZ Imager (Bio-Rad, USA)
- 8) เครื่อง Thermo cycler (Analytik Jena, Germany)
- 9) เครื่อง PCR gradient (BIO-RAD, USA)
- 10) เครื่อง electrophoresis (Mupid, Japan)



- 11) Water bath (Mettler, Germany)
- 12) Incubator shaking (Labtech, England)
- 13) ตู้ laminar air flow (Microtech, India)
- 14) เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius, Thailand)
- 15) เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (Mettler Toledo, USA)
- 16) ตู้ hot air oven (Mettler, Germany)
- 17) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (Autoclave) (Tomy, Japan)
- 18) ไมโครเวฟ (Electrolux, Thailand)
- 19) จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (SciLabware, UK)
- 20) ขวดรูปชมพู่ ขนาด 50, 250 และ 500 มล. (SciLabware, UK)
- 21) เครื่องกวนสาร (DAIHAN Scientific, Korea)

### 3. สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์สำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอ

#### 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอ

- 1) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (Merck Millipore, Germany)
- 2) Tris-HCl (Bio Basic, Canada)
- 3) Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA)  
(Bio Basic, Canada)
- 4) Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Merck, Germany)
- 5)  $\beta$ -mercaptoethanol (Bio Basic, Canada)
- 6) Polyvinyl polypyrrolidone (PVPP) (Sigma-alorich, China)
- 7) Phenol, Saturated (Amresco, USA)
- 8) ไนโตรเจนเหลว
- 9) Chloroform (RCL Labscan, Thailand)
- 10) Isoamyl alcohol (J.T. Baker, USA)
- 11) Lithium chloride (LiCl) (Fisher Scientific, UK)
- 12) Absolute ethanol (J.T. Baker, USA)

13) Diethyl pyrocarbonate (DEPC) (Panreac AppliChem, Spain)

14) Sodium acetate (NaAC) (Ajax Finechem, Australia)

### 3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอ

1) โกร่งบดตัวอย่าง

2) หลอด screw cap (Neptune, USA)

3) เครื่อง centrifuge 4 องศาเซลเซียส (Hettich, Germany)

4) Pipettes P2, P20, P200, P1000 (Thermo Fisher Scientific, USA)

5) Pipettes tips (Greinerbio-one, Austria)

6) หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml (Sorenson BioScience, USA)

8) ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส (Panasonic, Thailand)

10) Gel Doc<sup>TM</sup> EZ Imager (Bio-Rad, USA)

## 4. สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์สำหรับการสังเคราะห์ Complementary DNA (cDNA)

### 4.1. สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ Complementary DNA (cDNA)

1) Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)

2) Diethyl pyrocarbonate (DEPC) (Panreac AppliChem, Spain)

### 4.1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ Complementary DNA (cDNA)

1) เครื่องพีซีอาร์ Thermo cycler (Biometra, Germany)

2) Pipettes P2, P20, P200, P1000 (Thermo Fisher Scientific, USA)

3) Pipettes tips (Greinerbio-one, Austria)

4) หลอด microcentrifuge ขนาด 500  $\mu$ l (Sorenson BioScience, USA)

5) หลอด PCR ขนาด 200  $\mu$ l (Sorenson BioScience, USA)

## 5. สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์สำหรับเทคนิค quantitative real time RT-PCR (qRT-PCR)

### 5.1 สารเคมีที่ใช้ในการทำเทคนิค qRT-PCR

- 1) SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, USA)
- 2) Diethylpyocarbonate (DEPC) (Panreac AppliChem, Spain)

### 5.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำเทคนิค qRT-PCR

- 1) Pipettes P2, P20, P200, P1000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 2) Pipettes tips (Greinerbio-one, Austria)
- 3) หลอด microcentrifuge ขนาด 500 µl (Sorenson BioScience, USA)
- 4) หลอด PCR ขนาด 200 µl (Sorenson BioScience, USA)

## 6. สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

### 6.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

- 1) เมทานอล (Methanol) (J.T. Baker, Canada)
- 2) Folin-Ciocalteu reagent (FCR) (Merck, Germany)
- 3) โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate) (Merck, Germany)
- 4) Gallic acid (Sigma, China)
- 5) น้ำกลั่น

### 6.2 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

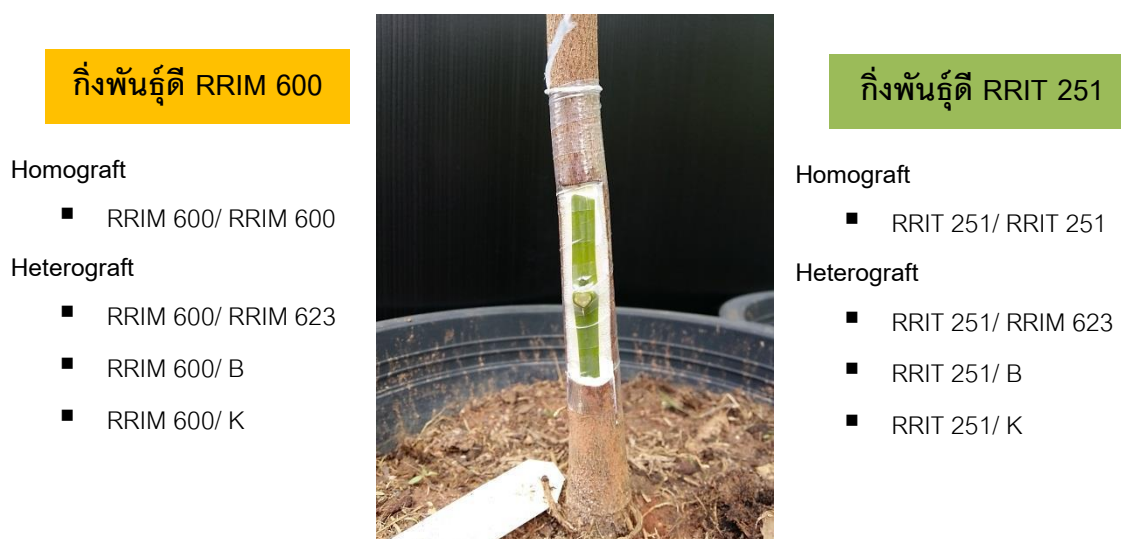
- 1) โกร่งบดตัวอย่าง
- 2) หลอดฝาเกลียวขนาด 50 มิลลิลิตร (Spllifesciences, Korea)
- 3) เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius, Thailand)

- 4) เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius, Thailand)
- 5) ตะแกรงหลอด
- 6) กรวยแก้ว
- 7) กระดาษกรอง watman เบอร์ 1 (Whatman, UK)
- 8) เครื่อง NanoDrop Spectrophotometer (Biodrop, UK)
- 9) คิวเวทท์ (Cuvette)
- 10) กระจกตวง
- 11) Pipettes P2, P20, P200, P1000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 12) Pipettes tips (Greinerbio-one, Austria)

## วิธีการดำเนินงาน

### 1. การติดต้ายางพาราพันธุ์พื้นเมืองกับกิ่งต่าพันธุ์ดี RRIM 600 และ RRIT 251

ทำการติดต้ายางพาราพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 บนต้อตอยางพาราพันธุ์ต่างๆ คือ พันธุ์ RRIM 623 พันธุ์พื้นเมืองบางรัก (B) และพันธุ์พื้นเมืองควนมดแดง (K) โดยแบ่งแปลงการทดลองออกเป็น 2 แปลงการทดลอง ได้แก่ แปลงการทดลองสำหรับการศึกษาแสดงออกของยีน *PAL* และปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด วางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ ทำการทดลอง 3 บล็อก (ซ้ำ) บล็อกละ 3 ต้น โดยแบ่งต้นตอสำหรับการติดตา 7 วัน, 14 วัน, 21 วัน และ 28 วัน และแปลงการทดลองสำหรับการศึกษาการเจริญเติบโตของกิ่งพันธุ์ดีบนต้นตอหลังการติดตา วางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ทำการทดลอง 3 บล็อก (ซ้ำ) บล็อกละ 3 ต้น (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 แสดงต้นตอพันธุ์พื้นเมืองที่ได้รับการติดต่าจากกิ่งต่าพันธุ์ดี

### 2. การเตรียมตัวอย่าง

สำหรับการทดลองการแสดงออกของยีน *PAL* เมื่อทำการติดตาไปแล้ว 7 วัน, 14 วัน, 21 วัน และ 28 วัน ทำการเก็บส่วนเปลือกของต้นตอ และกิ่งต่าบริเวณส่วนเปลือกที่เกิดรอยเชื่อมประสานกัน เพื่อนำมาสกัดอาร์เอ็นเอสำหรับวิเคราะห์การแสดงออกของยีน และหาปริมาณฟีนอลิก

(รูปที่ 9) ในส่วนของแปลงการทดลองสำหรับศึกษาการเจริญเติบโตของต้นตอยางพารา เมื่อทำการติดตามไปแล้ว 21 วัน ทำการตรวจดูการเจริญเติบโต โดยแผ่นตาที่ยังมีสีเขียวแสดงว่าการติดตามประสบความสำเร็จ ใช้มีดกรีดพลาสติกบริเวณด้านตรงข้ามออก ถ้าแผ่นตาเปลี่ยนเป็นสีดำหรือน้ำตาลแสดงว่าการติดตามไม่ประสบความสำเร็จ ใช้มีดกรีดพลาสติกด้านหลังออกเพื่อทำการติดตามซ้ำ และเมื่อนำพลาสติกออก ปล่อยให้ต้นที่ติดตามอยู่ในแปลงไม่น้อยกว่า 1 สัปดาห์ก่อนทำการตัดต้นเดิมทิ้ง โดยตัดยอดต้นตอยางพาราเหนือรอยที่ติดตามขึ้นไปประมาณ 5 เซนติเมตร และให้รอยตัดลาดเอียงลงทางด้านตรงข้ามแผ่นตา หลังจากนั้นประมาณ 15 วัน ทำการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จของการติดตามอีกครั้ง และการเก็บข้อมูลการเจริญเติบโต



**รูปที่ 9** แสดงการเก็บส่วนของเปลือกยางบริเวณที่ทำการติดตามสำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอ และตรวจสอบปริมาณพีโนลิก

### 3. การโคลนยีน *PAL* ในยางพารา

#### 3.1 การออกแบบไพรเมอร์

3.1.1 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนกลางยีน *PAL* ในยางพารา

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAL* ในพืชอื่นมาทำการวิเคราะห์ multiple alignment ด้วยโปรแกรม GENETYX-WIN version 5.0 เพื่อใช้ในการออกแบบ degenerate primer โดยค้นหาข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ซึ่งพืชที่นำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนกลางยีน *PAL* ในยางพาราเป็นพืชที่อยู่ในอันดับ Malpighiales ได้แก่ คริสต์มาส, มังคุด, สล่อน และสบู่ดำ ซึ่งอยู่ในอันดับเดียวกันกับยางพารา

3.1.2 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนปลาย 3' และปลาย 5' ของยีน *PAL*

ออกแบบ specific primers จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนกลางยีน *PAL* ที่ได้ทำการโคลน และใช้ร่วมกับ universal primers สำหรับการโคลนปลาย 3' และปลาย 5' (ตารางที่ 2) เพื่อใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (full length) และส่งตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

## ตารางที่ 2 ชนิดของไพรเมอร์สำหรับการโคลนยีน PAL

Primers (5' → 3')	T <sub>m</sub> (C°)	Expected size (bp)
<b>Degenerate primers</b>		
PAL1_F = GCTGGDATYTTYGGCAA	51.3	1,352
PAL6_R = GCCTYAGYTTYTGATCA	51.6	
<b>3' RACE</b>		
PAL_SF2 = GGAGGAGAATCTGAAGCA	51.1	650
PAL_SF3 = GGTTCTAACTACGGGTGCT	54.1	
B26 = GACTCTAGACGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTT	56.5	650
B25 = GACTCTAGACGACATCGA	50.1	
<b>5' RACE</b>		
PAL_F2 = AATGGCTACCAAAATGGTTCTT	52.9	490
PAL_R1 = TGATCCTCACTAGCATAGCTGCT	57.5	
PAL_full = ATGGCAACAATYWYYSRRAATGGT	56.6	250
PAL_R2 = GATTCTGCAAGCTCCACCT	55	

### 3.2 การสกัดอาร์เอ็นเอ (ดัดแปลงจาก Venkatachalam *et al.*, 1999)

ทำการสกัดอาร์เอ็นเอจากส่วนเปลือกของต้นยางพาราบริเวณที่ทำการติดตา 0.1 กรัมบดด้วยไนโตรเจนเหลวจนละเอียด ใส่ในหลอด screw cap ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ (0.2 M NaCl, 0.1 M Tris HCl pH 7.0, 0.01 M EDTA, 1.5% SDS และ 2%  $\beta$ -mercaptoethanol) 500 ไมโครลิตร และสารละลายฟีนอล 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติมหคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์อัตราส่วน 24: 1 ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติม 8 โมลาร์ ลิเทียมคลอไรด์ ปริมาตร 1/3 เท่าของส่วนใส พลิกหลอดไปมาเบาๆ และนำไปตกตะกอนอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่



ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เทสารละลายด้านบนทิ้ง เติม 2 โมลาร์ ลิเทียมคลอไรด์ 1 เท่าของปริมาตรรวม นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทสารละลายด้านบนทิ้ง และเติม 100% เอทานอล 1 เท่าของปริมาตรรวม นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทสารละลายด้านบนทิ้ง ตากตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้งนาน 10-15 นาที ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำ DEPC (DEPC-treated water) ปริมาตร 100-150 ไมโครลิตร ตกตะกอนอาร์เอ็นเอซ้ำด้วย 0.1 เท่าโดยปริมาตรของ 3 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตท (pH 5.2) และ 2.5 เท่าโดยปริมาตรของ 100% เอทานอลที่แช่เย็น นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทสารละลายด้านบนทิ้ง และล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 70% เอทานอล 2 ครั้ง เทสารละลายด้านบนทิ้ง ตากตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้ง นาน 10-15 นาที ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำ DEPC (DEPC-treated water) ปริมาตร 20-50 ไมโครลิตร และนำอาร์เอ็นเอที่ได้เก็บใน -20 องศาเซลเซียส

### 3.3 การตรวจสอบปริมาณ และคุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสง และเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

วัดปริมาณ และความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230, 260 และ 280 นาโนเมตร ( $A_{230}$ ,  $A_{260}$  และ  $A_{280}$ ) จดบันทึกค่าความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอในหน่วย นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/μl) และนำอาร์เอ็นเอที่ได้จากการสกัดมาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับ 10x loading dye 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และหยอดสารละลายทั้งหมดลงในหลุมของแผ่นเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% ในสารละลาย 0.5x บัฟเฟอร์ TBE เป็นตัวกลางในการนำกระแสไฟฟ้า ด้วยแรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อมเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบแถบ และขนาดของอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง UV transilluminator (Gel Doc) เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, USA)

### 3.4 การสังเคราะห์ Complementary DNA (cDNA) จากอาร์เอ็นเอด้วยปฏิกิริยา Reverse transcription โดยใช้เอนไซม์ Reverse transcriptase

ทำการสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากเปลือกบริเวณลำต้นของ ยางพาราตามวิธีการของ Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA) โดยการเตรียมปฏิกิริยาในปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย อาร์เอ็นเอของ เปลือก ลำต้นยางพาราความเข้มข้น 1 pg-5 µg, Oligo (dT)<sub>18</sub> primer 1 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP Mix 1 ไมโครลิตร และเติมน้ำ DEPC (DEPC-treated water) จนมีปริมาตรครบ 15 ไมโครลิตร นำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และวางบนน้ำแข็งทันที หลังจากนั้นเติม 5X RT Buffer 4 ไมโครลิตร และ Maxima H Minus Enzyme Mix 1 ไมโครลิตร นำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที, อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เก็บ cDNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.5 การตรวจสอบปริมาณ และคุณภาพของ Complementary DNA (cDNA) ด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสง

วัดปริมาณ และความบริสุทธิ์ของ cDNA ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230, 260 และ 280 นาโนเมตร ( $A_{230}$ ,  $A_{260}$  และ  $A_{280}$ ) จดบันทึกค่าความเข้มข้นของ cDNA ในหน่วย นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/ µl)

### 3.6 การโคลนยีน PAL ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์โดยใช้ degenerate primers

ทำการสังเคราะห์ยีน PAL บางส่วน จาก cDNA ของยางพาราด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ร่วมกับไพรเมอร์ชนิดดีเจเนอเรต (degenerate primer) ที่จับบริเวณลำดับเบสอนุรักษ์ของ ยีน PAL ในยางพารา โดยการนำไพรเมอร์ที่ได้มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์หาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการ นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (amplification) กับ cDNA ของยางพารา โดยทำการเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X High Fidelity PCR Buffer 2.5 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP mixture 0.5 ไมโครลิตร, 50 mM MgSO<sub>4</sub> 0.75 ไมโครลิตร, 10 µM PAL1\_F forward

primer 1 ไมโครลิตร, PAL6\_R reverse primer 1 ไมโครลิตร, 5 unit/  $\mu$ l Platinum® *Taq* High Fidelity (Invitrogen by life technologies, USA) 0.1 ไมโครลิตร, cDNA ของยางพาราความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร และน้ำ DEPC (DEPC-treated water) 18.15 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นดูดลงในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร นำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องพีซีอาร์ โดยตั้งอุณหภูมิ และกำหนดจำนวนรอบดังนี้

- 1) Pre-denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที
- 2) Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
- 3) Annealing อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
- 4) Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 34 รอบ

- 5) Post-extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, USA) หลังจากนั้นทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ปกติใช้อุณหภูมิในปฏิกิริยาของ annealing ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอชัดเจน โดยทำการเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X High Fidelity PCR Buffer 2.5 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP mixture 0.5 ไมโครลิตร, 50 mM MgSO<sub>4</sub> 0.75 ไมโครลิตร, 10  $\mu$ M PAL1\_F forward primer 1 ไมโครลิตร, PAL6\_R reverse primer 1 ไมโครลิตร, 5 unit/  $\mu$ l Platinum® *Taq* High Fidelity (Invitrogen by life technologies, USA) 0.1 ไมโครลิตร, cDNA ของยางพาราความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร และน้ำ DEPC (DEPC-treated water) 18.15 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นดูดลงในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร นำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องพีซีอาร์ Thermo cycler โดยตั้งอุณหภูมิ และกำหนดจำนวนรอบดังนี้

- 1) Pre-denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที
- 2) Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
- 3) Annealing อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
- 4) Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 34 รอบ

- 5) Post-extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
- 6) Hold อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 3.7 การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ทำการตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอโดยการนำผลผลิตของพีซีอาร์ปริมาตร 2 ไมโครลิตรผสมกับ 10x loading dye 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และหยอดสารละลายทั้งหมดลงในหลุมของแผ่นเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5% ในสารละลาย 0.5x บัฟเฟอร์ TBE เป็นตัวกลางในการนำกระแสไฟฟ้า ด้วยแรงเคลื่อนไฟฟ้า 75 โวลต์ เป็นเวลา 35 นาที โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA) ย้อมเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบแถบ และขนาดของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV transilluminator (Gel Doc) เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, USA)

### 3.8 การสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล และการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์

ตัดเจลบริเวณแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการบนแสง UV ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ทำการชั่งน้ำหนักแล้ว ทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ตามวิธีการของ E.Z.N.A<sup>®</sup> Gel Extraction Kit (Omega Bio-tek, USA) โดยทำการชั่งน้ำหนักเจลที่ตัดมาได้ (น้ำหนักเจล 0.3 กรัม จะมีปริมาตรเท่ากับ 0.3 มิลลิลิตร) เติม 1 volume Binding Buffer (XP2) หลอมละลายเจลที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที เขย่าหลอดทุกๆ 2-3 นาที หรือจนกระทั่งเจลหลอมละลายอย่างสมบูรณ์ ใส่ HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column ในหลอด 2 ml Collection เติมสารละลายที่มีดีเอ็นเอหรือเจลปริมาตรไม่เกิน 700 ไมโครลิตรลงใน HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายส่วนด้านล่างทิ้ง และนำหลอด 2 ml Collection มาใช้ซ้ำ เติมสารละลายที่มีดีเอ็นเอหรือเจลปริมาตรไม่เกิน 700 ไมโครลิตรลงใน HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column จนหมด แล้วเติม Binding Buffer (XP2) 300 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายส่วนด้านล่างทิ้ง และนำหลอด 2 ml Collection มาใช้ซ้ำ เติม SPW Wash Buffer 700 ไมโครลิตร (SPW Wash Buffer ต้องทำการเจือจางด้วย 100% ethanol ก่อนนำมาใช้) นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายส่วนด้านล่างทิ้ง และนำหลอด 2 ml

Collection มาใช้ซ้ำ เต็ม SPW Wash Buffer 700 ไมโครลิตร อีก 1 ครั้ง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำ DEPC (DEPC-treated water) และนำหลอด 2 ml Collection มาใช้ซ้ำ นำหลอดเปล่าของ HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้ Column แห่งนี้ ย้าย HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ และเปิดฝา HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 5 นาที เพื่อให้เอทานอลระเหยออกจาก HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column จนหมด เต็มน้ำ DEPC (DEPC-treated water) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (Elute 1) ลงบริเวณกลางแผ่นกรองของ HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อชะดีเอ็นเอให้ลงมาที่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำการชะดีเอ็นเออีกครั้งโดยการเติมน้ำ DEPC (DEPC-treated water) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (Elute 2) เก็บดีเอ็นเอที่ได้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.9 การตรวจสอบคุณภาพ และดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้จากการสกัดออกจากเจล

ทำการตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยการนำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดออกจากเจลปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับ 10x loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และหยอดสารละลายทั้งหมดลงในหลุมของแผ่นเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5% ในสารละลาย 0.5x บัฟเฟอร์ TBE เป็นตัวกลางในการนำกระแสไฟฟ้า ด้วยแรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อมเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบแถบ และขนาดของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV transilluminator (Gel Doc) เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, USA)

### 3.10 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอสายผสมระหว่างชิ้นส่วนยีน PAL กับพลาสมิด RBC TA cloning vector

นำดีเอ็นเอของส่วนยีน PAL เชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด RBC TA cloning vector (RBC Bioscience, Taiwan) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase (RBC Bioscience, Taiwan) โดยการเตรียมปฏิกิริยาปริมาตร 10 ไมโครลิตร ในหลอด PCR ขนาด 200 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย ligation buffer A 1 ไมโครลิตร, ligation buffer B 1 ไมโครลิตร, RBC TA cloning vector 2 ไมโครลิตร, ดีเอ็นเอของส่วนยีน PAL 5 ไมโครลิตร และ T4 DNA ligase 1 ไมโครลิตร ผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยการดูดขึ้นลงเบาๆ โดยการใช้ปิเปต และบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 3.11 การถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$

ทำการถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ด้วยวิธีการ heat shock โดยดัดแปลงวิธีการตาม RBC HIT Competent cell (RBC Bioscience, Taiwan) ภายในตู้ย่ายเลี้ยง เริ่มจากการนำ Competent cell แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  มาวางไว้บนน้ำแข็ง และรอจน Competent cell ละลาย 1/3 ของปริมาตร Competent cell เติมดีเอ็นเอสายผสม pTA-PAL ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ตีหลอดเบาๆ เพื่อให้ Competent cell และดีเอ็นเอสายผสม pTA-PAL เข้ากัน วางไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที เมื่อครบเวลาให้รีบนำมารวมกับน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 20 นาที เติมอาหารเหลว LB (Luria-Bertani broth) ไม่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสก่อนนำมาใช้) ปริมาตร 892 ไมโครลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็น 1 ชั่วโมง 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ใช้ปิเปตดูดอาหารเหลว LB ออก 800 ไมโครลิตร และดูดเป่าตะกอน Competent cell ด้วยปิเปตเบาๆ จนอาหารเหลว LB และตะกอน Competent cell นั้นเข้ากัน นำสารแขวนลอยเซลล์ที่ได้เกลี่ยบนอาหารแข็ง LB (Luria-Bertani agar) ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (อุณหภูมิเลี้ยงเชื้ออาหารแข็ง LB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้) บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว สีขาวขุ่น

### 3.12 การตรวจสอบพลาสมิดที่มียีนเป้าหมายโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์

นำโคโลนีเดี่ยว สีขาวขุ่นของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ที่มีดีเอ็นเอสายผสมของ pTA-PAL มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง จนกว่าเชื้อที่เขย่าเลี้ยงมีสีขุ่น หลังจากนั้นทำการตรวจสอบชิ้นส่วนของยีน PAL ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยเตรียมปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x ThermoPol Reaction Buffer 3 ไมโครลิตร, 10 mM dNTPs 1 ไมโครลิตร, 10  $\mu$ M PAL1 forward primer 1 ไมโครลิตร, 10  $\mu$ M PAL6 reverse primer 1 ไมโครลิตร, 0.025 unit/  $\mu$ l *Taq* DNA polymerase (New England Biolabs, USA) 0.25 ไมโครลิตร, Template DNA (เชื้อที่ทำการเขย่าเลี้ยงในอาหารเหลว LB) 2 ไมโครลิตร และน้ำ DEPC (DEPC-treated water) 16.75 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันในหลอด PCR ขนาด 200 ไมโครลิตร นำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องพีซีอาร์ Thermo cycler โดยตั้งอุณหภูมิ และกำหนดจำนวนรอบดังนี้

- 1) Pre-denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที
  - 2) Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
  - 3) Annealing อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
  - 4) Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
- ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 34 รอบ
- 5) Post-extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
  - 6) Hold อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ทำการเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, USA) เลือกลโคโลนีที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 1,352 คู่เบสจาก master plate เพื่อนำไปใช้ในการสกัด พลาสมิดต่อไป

### 3.13 การสกัดแยกดีเอ็นเอสายผสมจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$

ทำการเขย่าเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  จากโคโคโนสี้ขาวขุ่นที่ปรากฏแถบ ดีเอ็นเอของยีน PAL ในข้อ 1.12 เลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง ทำการแยกสกัดดีเอ็นเอสายผสม pTA-PAL ตามวิธีการของ E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid DNA Mini Kit I (Omega Bio-tek, USA) โดยการดูดเซลล์แบคทีเรียใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 1-5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายหรืออาหารเลี้ยงแบคทีเรียทิ้ง เติมน้ำ Solution I/ RNase (เติมน้ำ RNase A ก่อนนำมาใช้ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ละลายตะกอนเซลล์ด้วยการบีบแผ่นขึ้นลงเบาๆ ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำ Solution II ปริมาตร 250 ไมโครลิตร พลิกกลับหลอดไปมาหลายๆ ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-3 นาที จากนั้นเติมน้ำ Solution III ปริมาตร 350 ไมโครลิตร และพลิกหลอดกลับไปมาหลายๆ ครั้งทันที จนเห็นตะกอนสีขาวขุ่น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 นาที ดูดสารละลายใสปริมาตร 700 ไมโครลิตร ใส่ลงใน HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column ที่บรรจุอยู่บนหลอด Collection ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายด้านล่างทิ้ง เติมน้ำ HB buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายด้านล่างทิ้ง เติมน้ำ DNA Wash Buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร (DNA Wash buffer ต้องเติมน้ำ 100% ethanol ก่อนนำมาใช้) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายด้านล่างทิ้ง เติมน้ำ DNA Wash Buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร อีก 1 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายด้านล่างทิ้ง นำหลอดเปล่าไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ Column แห้ง เปิดฝา HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เพื่อให้เอทานอลระเหยออกจาก Column จากนั้นย้าย Column ใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติมน้ำ DEPC (DEPC-treated water) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (Elute 1) ลงบริเวณกลาง filter ของ HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อชะดีเอ็นเอสายผสมลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมน้ำ DEPC (DEPC-treated water) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (Elute 2) ลงบริเวณกลาง filter ของ HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อชะดีเอ็นเอสายผสมลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บดีเอ็นเอสายผสมที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



### 3.14 การตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณของดีเอ็นเอสายผสม

วัดปริมาณ และความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอสายผสม pTA-PAL ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230, 260 และ 280 นาโนเมตร ( $A_{230}$ ,  $A_{260}$  และ  $A_{280}$ ) จดบันทึกค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอสายผสม pTA-PAL ในหน่วย นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/  $\mu$ l) และนำดีเอ็นเอสายผสม pTA-PAL ที่ได้จากการสกัดแยกมาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับ 10x loading dye 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และหยอดสารละลายทั้งหมดลงในหลุมของแผ่นเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% ในสารละลาย 0.5x บัฟเฟอร์ TBE เป็นตัวกลางในการนำกระแสไฟฟ้า ด้วยแรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อมเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบแถบ และขนาดของดีเอ็นเอสายผสมด้วยเครื่อง UV transilluminator (Gel Doc) เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, USA)

### 3.15 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PAL

เลือกโคลนที่ถูกต้องนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ Universal primer คือ M13F และ M13R เมื่อได้ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์นำมาผลที่ได้มาตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PAL กับฐานข้อมูล GenBank ของเว็บไซต์ NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) โดยใช้โปรแกรม nucleotide blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เพื่อหาค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) ของยีน PAL กับพืชอื่นๆ ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล

### 3.16 การหาลำดับเบสของยีน *PAL* ด้านปลาย 3' โดยใช้เทคนิค Rapid Amplification cDNA Ends (RACE)

#### 3.16.1 การทำ 3' RACE

หลังจากทราบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน (partial sequences) ของยีน *PAL* ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ร่วมกับไพรเมอร์ชนิดดีเจเนอเรต (degenerate primer) ที่จับบริเวณลำดับเบสอนุรักษ์ของยีน *PAL* ในยางพารา นำข้อมูลที่ได้ดังกล่าวมาออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (full length) ชนิดจำเพาะเพื่อใช้คู่กับไพรเมอร์ Adaptor ของ Oligo-dT บริเวณปลาย 3' RACE cDNA ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ตารางที่ 2) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่มี 2 ขั้นตอน ขั้นตอนที่ 1 ทำ 3' RACE PCR โดยการเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ในปริมาตร 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย น้ำ DEPC (DEPC-treated water) 18.05 ไมโครลิตร, 10X PCR Buffer 2.5 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP mix 0.5 ไมโครลิตร, 50 mM MgSO<sub>4</sub> 0.75 ไมโครลิตร, 10 μM B26 primer 1 ไมโครลิตร, 10 μM PAL\_SF2 primer 1 ไมโครลิตร, 5 unit/ μl Platinum<sup>®</sup> Taq High Fidelity (Invitrogen by life technologies, USA) 0.1 ไมโครลิตร และ cDNA ของยางพาราความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันในหลอด PCR ขนาด 200 ไมโครลิตร นำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องพีซีอาร์ ตั้งอุณหภูมิ และกำหนดจำนวนรอบดังนี้

- 1) Pre-denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที
  - 2) Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
  - 3) Annealing อุณหภูมิ 51.1 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
  - 4) Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
- ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 34 รอบ
- 5) Post-extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, USA)

### 3.16.2 การทำปฏิกิริยา Nested PCR

จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขั้นตอนแรกที่มีขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ต้องการมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาของพีซีอาร์ในขั้นตอนที่ 2 ซึ่งเป็นการทำปฏิกิริยา พีซีอาร์แบบ Nested PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จับในบริเวณ poly A tail ของปลาย 3' คือ B25 primer ร่วมกับไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งจับในบริเวณยีน PAL คือ PAL\_SF3 primer ทำการเตรียมปฏิกิริยา พีซีอาร์ในปริมาตร 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย น้ำ DEPC (DEPC-treated water) 18.05 ไมโครลิตร, 10X PCR Buffer 2.5 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP mix 0.5 ไมโครลิตร, 50 mM MgSO<sub>4</sub> 0.75 ไมโครลิตร, 10 μM B26 primer 1 ไมโครลิตร, 10 μM PAL\_SF2 primer 1 ไมโครลิตร, 5 unit/ μl Platinum<sup>®</sup> Taq High Fidelity (Invitrogen by life technologies, USA) 0.1 ไมโครลิตร และผลผลิตพีซีอาร์ในครั้งแรก 1 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันในหลอด PCR ขนาด 200 ไมโครลิตร นำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องพีซีอาร์ ตั้งอุณหภูมิ และกำหนดจำนวนรอบ ดังนี้

- 1) Pre-denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที
  - 2) Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
  - 3) Annealing อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
  - 4) Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
- ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 34 รอบ
- 5) Post-extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
  - 6) Hold อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ทำการเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, USA) เมื่อได้แถบดีเอ็นเอที่ถูกต้องทำตามขั้นตอนข้อ 3.8-3.15

### 3.17 การสังเคราะห์ยีน PAL ด้านปลาย 5'

เนื่องจากการหาลำดับยีน PAL ด้านปลาย 5' ไม่สามารถสังเคราะห์ได้ด้วยวิธี 5' RACE ได้ จึงทำการสังเคราะห์ยีน PAL ในส่วนของปลาย 5' โดยทำการออกแบบ degenerate primer จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของมันสำปะหลังและสบู่ดำ ซึ่งมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ

ยางพารามากที่สุด จากด้านปลาย 5' บริเวณของ Start codon (ตารางที่ 2) และทำการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกใช้พีซีอาร์ โดยทำตามขั้นตอนข้อ 3.6- 3.15

#### 4. การศึกษาการแสดงออกของยีน *PAL* โดยใช้เทคนิค quantitative real time RT-PCR (qRT-PCR)

##### 4.1 การออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน *PAL*

ทำการออกแบบไพรเมอร์โดยการออกแบบ forward primer และ reverse primer สำหรับการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR จากข้อมูลลำดับเบส cDNA ของยีน *PAL* โดยอาศัยลำดับเบสของ cDNA ที่ได้จากการโคลนยีนดังกล่าว เพื่อนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยใช้ซอฟต์แวร์จากเว็บไซต์ [www.genscript.com](http://www.genscript.com) หรือโปรแกรม Primer3 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/>) โดยไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับศึกษาการแสดงออกของยีนมีดังต่อไปนี้

ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน *PAL* ได้แก่

query\_F3 = 5' GGACATGCTCAAAGTTGTGG 3'

query\_R3 = 5' TGCTGGCATTCTTCTCATT 3'

ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับตรวจสอบยีน actin หรือ 18s rRNA เพื่อใช้เป็นยีนอ้างอิง ได้แก่

18s rRNA\_F = 5' AAGCCTACGCTCTGGATACATT 3'

18s rRNA\_R = 5' CCCGACTGTCCCTGTTAATC 3'

##### 4.2 การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ก่อนการศึกษาการแสดงออกของยีน *PAL* ด้วยเทคนิค quantitative real time PCR (qPCR)

นำ cDNA ที่ได้มาตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ด้วยเทคนิค quantitative real time PCR (qPCR) ก่อนการนำไปใช้ศึกษาการแสดงออกของยีน *PAL* โดยการเตรียมปฏิกิริยา Real-time PCR ด้วย SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, USA) ใช้ cDNA ของเปลือกยางพาราคความเข้มข้น 80 ng/ total reaction ปริมาตร 10 µl เป็นแม่แบบ และใช้

forward primer และ reverse primer ที่ได้จากการออกแบบในการสังเคราะห์ยีน *PAL* ของยางพารา ตั้งอุณหภูมิ และกำหนดจำนวนรอบดังนี้ การแยกสายดีเอ็นเอออกจากกันใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จำนวน 39 รอบ ได้แก่ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และใช้ยีน 18s rRNA เป็นยีนอ้างอิง ทำการตรวจวิเคราะห์ค่า melting curve ที่ได้จากการอ่านค่าของเครื่อง Real-time PCR ในกรณีที่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากกว่าหนึ่งแถบจะไม่สามารถนำไปใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *PAL* ด้วยการให้เทคนิค quantitative real time RT-PCR (qRT-PCR) ได้โดยต้องทดสอบไพรเมอร์คู่ใหม่หรือออกแบบไพรเมอร์ใหม่อีกครั้ง

#### 4.4 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค quantitative real time RT-PCR (qRT-PCR)

นำ cDNA ของเปลือกลำต้นยางพาราที่ได้จากการสกัดมาเตรียมความเข้มข้น ให้เป็น 80 ng/  $\mu$ l เพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *PAL* ในยางพาราที่ติดต่อด้วยต้นตอต่างๆ โดยการใช้เทคนิค quantitative real time PCR (qPCR) เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *PAL* กับเป็นยีนอ้างอิงคือยีน 18s rRNA ทำปฏิกิริยา Real-time PCR ด้วย SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, USA) โดยใช้ cDNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ความเข้มข้น 80 ng/ total reaction ปริมาตร 10  $\mu$ l เป็นแม่แบบ และใช้ forward primer และ reverse primer ที่ได้จากการออกแบบในการสังเคราะห์ยีน *PAL* ของยางพารา โดยตั้งอุณหภูมิ และกำหนดจำนวนรอบดังนี้ การแยกสายดีเอ็นเอออกจากกันใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จำนวน 39 รอบ ได้แก่ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที นำค่า Ct ที่ได้จากการอ่านค่าของเครื่อง Real-time PCR มาวิเคราะห์ผลด้วยวิธี  $\Delta\Delta C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$  method) ตามวิธีการของ Livak และ Schmittgen, (2001) เพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนโดยใช้ยีน 18s rRNA เป็นยีนอ้างอิง

## 5. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่เกิดขึ้นหลังจากการติดตาม

### 5.1 การสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากเปลือกลำต้นยางพาราสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

นำเปลือกลำต้นยางพาราที่ไม่ได้ทำการติดตาม และเปลือกลำต้นยางพาราบริเวณที่ทำการติดตามผ่านมาแล้ว 7 วัน, 14 วัน, 21 วัน และ 28 วัน มาสกัดหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยทำการชั่งตัวอย่างเปลือกยางพารา 0.1 กรัม บดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายเมทานอลความเข้มข้น 80% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท และเขย่าให้เข้ากัน วางหลอดทดลองฝาเกลียวใสในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ  $60 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลาวางหลอดตัวอย่างไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง กรองตัวอย่างด้วยกระดาษกรองวอทแมน เบอร์ 1 ลงในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 25 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท เก็บไว้ในที่อุณหภูมิ  $8 \pm 1$  องศาเซลเซียส

### 5.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากส่วนเปลือกลำต้นยางพาราที่ได้รับการติดตาม และไม่ได้รับการติดตาม

นำสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการสกัดหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ดัดแปลงวิธีการจาก Shui *et al.*, 2006; จิราพร, 2553) โดยการเติมน้ำกลั่นปริมาตร 9.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ 0.5 มิลลิลิตร และโพลิน ซีโอแคลทู รีเอเจนต์ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที (สีของสารละลายมีสีเขียวใส) เมื่อครบเวลาเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 10% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากัน วางหลอดในที่มีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที (สีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เทียบกับหลอดควบคุม คือ สารละลายเมทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่าง ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดหาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลายกรดแกลลิก (Gallic acid) ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วยมิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักเปลือกปริมาณ 1 กรัม (mg GAE/g) (กราฟมาตรฐานสารละลายกรดแกลลิกแสดงในภาคผนวกรูปที่ 2)

## 6. การศึกษาการเจริญเติบโตของต้นตอกับกิ่งพันธุ์ดีหลังการติดตา

ทำการศึกษาปฏิบัติการระหว่างต้นตอพันธุ์ต่างๆ กับกิ่งตอพันธุ์ดี RRIM 600 และ RRIT 251 หลังติดตาไปแล้ว 21 วัน ทำการตรวจสอบการเจริญเติบโตโดยหากแผ่นตายังมีสีเขียว แสดงว่าการติดตาประสบผลสำเร็จ และใช้มีดกรีดพลาสติกบริเวณด้านตรงข้ามออก หลังจากนั้นปล่อยให้ต้นที่ติดตาอยู่ในแปลงไม่น้อยกว่า 1 สัปดาห์ ก่อนทำการตัดต้นเดิมทิ้ง โดยตัดยอดต้นตอเหนือรอยที่ติดตาขึ้นไปประมาณ 5 เซนติเมตร และให้รอยตัดลาดเอียงลงทางด้านตรงข้ามแผ่นตอ หลังจากนั้นประมาณ 15 วัน ทำการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จของการติดตาอีกครั้ง และเก็บข้อมูลการเจริญเติบโต ได้แก่ จำนวนวันที่แตกตาใหม่หลังจากตัดยอดต้นตอ ความยาวของยอดใหม่ที่เกิดขึ้น (หลังจากตัดยอด 14 วัน) เส้นผ่านศูนย์กลางของยอดใหม่ และจำนวนใบ (ใบเพศลาด) ในกรณีแผ่นตอเปลี่ยนเป็นสีดำหรือสีน้ำตาล แสดงว่าการติดตาไม่ประสบผลสำเร็จกรณีนี้จะใช้มีดกรีดพลาสติกด้านหลังออกเพื่อทำการติดตาซ้ำ

## 7. การวิเคราะห์ผลข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ (Randomized complete block design, RCB) วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วยวิธี One-Way ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยระดับการแสดงออกของยีนด้วยวิธี least significant difference (LSD)

### บทที่ 3

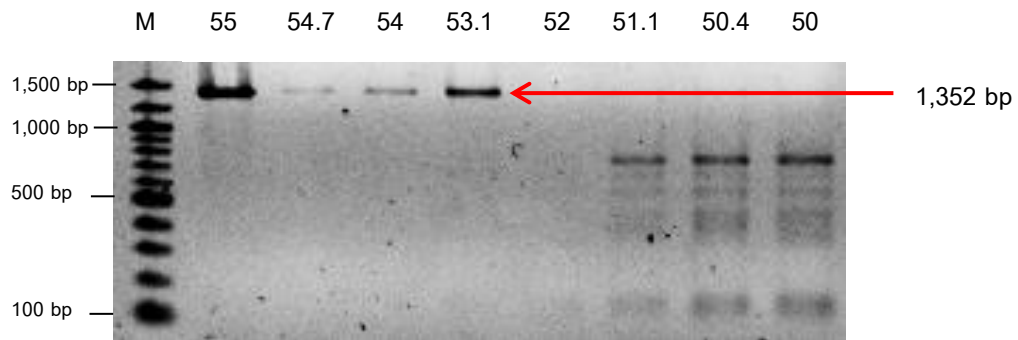
#### ผล

#### 1. การโคลนยีน Phenylalanine ammonia lyase (PAL) จากส่วนเปลือกของยางพารา

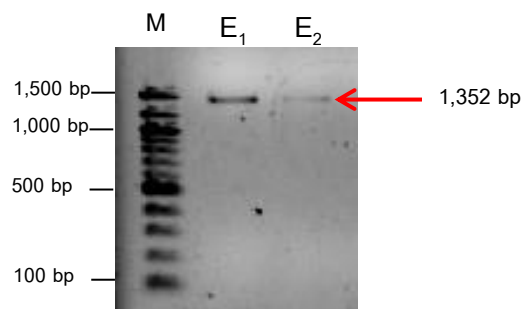
##### 1.1 การหาลำดับเบสของยีน PAL บางส่วน (partial sequencing) จาก cDNA ยางพาราโดยใช้ Degenerated primers

ทำการหาลำดับเบสของยีน PAL บางส่วนด้วยการออกแบบ degenerate primers จากข้อมูลลำดับเบสของยีน PAL ในพืชอื่นมาทำการวิเคราะห์ multiple alignment ด้วยโปรแกรม GENETYX-WIN version 5.0 โดยค้นหาข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งพืชที่นำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของกลางยีน PAL ในยางพาราเป็นพืชที่อยู่ในอันดับ Malpighiales ได้แก่ คริสต์มาส, มังคุด, ส้ม และสบู่ดำ ซึ่งอยู่ในอันดับเดียวกันกับยางพารา ซึ่งผลที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขั้นแรกคือ การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยาของไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยการทำ gradient PCR พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการนำมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับ cDNA ของยางพารา คือ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (รูปที่ 10) ในขั้นตอนต่อมาการนำไพรเมอร์ PAL1\_Forward primer และ PAL6\_Reverse primer มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ปกติใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส ผลของการทำปฏิกิริยาของพีซีอาร์ได้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเท่ากับ 1,352 นิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน หลังจากนั้นสกัดแยกผลผลิตพีซีอาร์ออกจากเจลโดยใช้ E.Z.N.A.<sup>®</sup> Gel Extraction Kit (รูปที่ 11) นำดีเอ็นเอที่ได้เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ RBC TA cloning ทำการถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอซึ่งมีขนาด 1,352 นิวคลีโอไทด์ ทำการคัดเลือกโคโลนีสีขาวขึ้น เพื่อตรวจสอบชิ้นส่วนของยีน PAL ที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ RBC TA cloning (pTA- PAL) ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์พบขนาดของชิ้นส่วนยีนประมาณ 1,352 นิวคลีโอไทด์ (รูปที่ 12) คัดเลือกโคโลนีที่ต้องการนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มาสกัดแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอสายผสม pTA- PAL ออกจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  โดยใช้ E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid DNA Mini Kit I ตรวจสอบปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอสายผสม pTA-PAL ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง และนำดีเอ็นเอสายผสม pTA-PAL ที่สกัดได้มาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (รูปที่ 13) นำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ Universal primer คือ M13F และ M13R

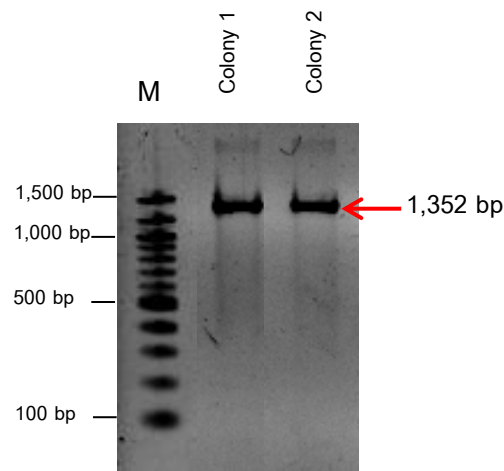




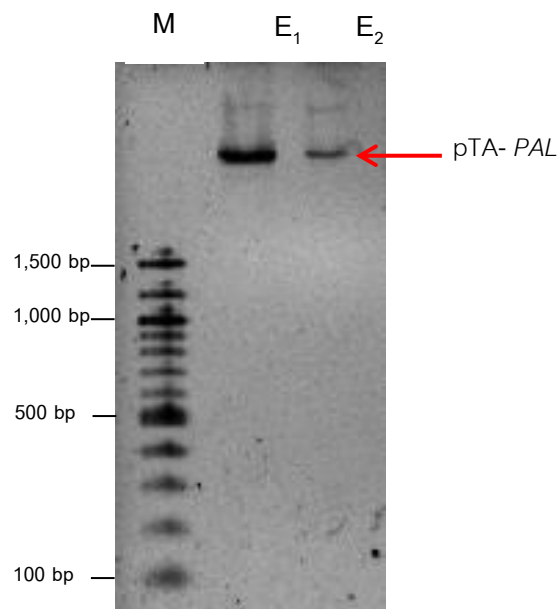
**รูปที่ 10** ผลการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จาก cDNA ส่วนเปลือกของยางพารา อุณหภูมิที่เหมาะสมของไพรเมอร์ PAL1\_Forward primer และ PAL6\_Reverse primer คือ 55 องศาเซลเซียส และได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,352 นิวคลีโอไทด์ เมื่อเปรียบเทียบกับ GeneRuler 100 bp DNA Ladder (M)



**รูปที่ 11** ผลการสกัดแยกผลผลิตพีซีอาร์ออกจากเจล และการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยใช้ E.Z.N.A<sup>®</sup> Gel Extraction Kit ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,352 นิวคลีโอไทด์ เมื่อเปรียบเทียบกับ GeneRuler 100 bp DNA Ladder (M)



**รูปที่ 12** ผลการตรวจจอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอบางส่วนของยีน *PAL* ที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ RBC TA cloning จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler 100 bp DNA Ladder (M)



**รูปที่ 13** ผลการสกัดแยกดีเอ็นเอสายผสม pTA- *PAL* จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler 100 bp DNA Ladder (M)

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAL* พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAL* ที่โคลนได้มีขนาด 1,352 นิวคลีโอไทด์ (รูปที่ 14) เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAL* จากยารพารา ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAL* ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม nucleotide blast พบว่ายีน *PAL* ที่สังเคราะห์ได้จากส่วนเปลือกของยารพารามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAL* ของมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) 94 เปอร์เซ็นต์ ละหุ่ง (*Ricinus communis*) 88 เปอร์เซ็นต์ สบู่ดำ (*Jatropha curcas*) 86 เปอร์เซ็นต์ โกงกางใบใหญ่ (*Rhizophora mangle*) 85 เปอร์เซ็นต์ มังคุด (*Garcinia mangostana*) 82 เปอร์เซ็นต์ องุ่น (*Vitis vinifera*) 81 เปอร์เซ็นต์ ส้มแมนดาริน (*Citrus reticulata*) 81 เปอร์เซ็นต์ ส้มผด (*Rhus chinensis*) 81 เปอร์เซ็นต์ และชา (*Camellia sinensis*) 80 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 3

GCTGGGATTT	TTGGCAATAA	CACAGAATCA	TGTCACACTT	TGTCACACTC	TGCAACAAGA
GCAGCTATGC	TAGTGAGGAT	CAACACTCTC	CTCCAAGGTT	ACTCAGGCAT	TAGATTTGAA
ATCTTGGAAG	CCATCACCAA	GCTCCTCAAC	CACAACATTA	CTCCATGCTT	GCCGCTCCGA
GGCACAATCA	CTGCTTCAGG	GGATTTAGTT	CCATTGTCAT	ACATTGCTGG	ATTACTCACT
GGCCGGCCTA	ATTCCAAGGC	TGTTGGCCCC	AATGGGGAAT	CCTTAGATGC	CCAGCAAGCC
TTTTCGCTTTG	CTGGTATTGA	CTCTGGCTTC	TTTGAGTTGC	AGCCTAAAGA	AGGCCTTGCT
CTGGTTAATG	GCACTGCAGT	TGGTTCTGGC	TTGGCTTCTA	TGGTTCTTTT	TGAGGC AAAA
GTTCTTGCTG	TTTTATCAGA	AGTTTTATCA	GCAATTTTCG	CAGAGTTTAT	GAATGGAAAA
CCTGAATTTA	CTGATCACTT	GACACATAAA	TTAAAGCATC	ATCCGGGGCA	AATAGAGGCT
GCAGCTATAA	TGGAGCACAT	TTTAGATGGT	AGCTCTTATA	TTAAAGCAGC	TAAGAAGTTG
CATGAAATGG	ATCCCTTGCA	GAAACCAAAG	CAAGATCGAT	ATGCTCTCAG	GACTTCACCA
CAATGGCTAG	GTCCTCAGAT	TGAAGTTATC	AGATTCTCAA	CTAAATCAAT	CGAAAAGAGAG
ATTAATTCAG	TGAATGACAA	CCCTTTGATT	GATGTTTCTA	GGAACAAGGC	CTTACATGGT
GGAAATTTCC	AAGGGACCCC	GATTGGAGTC	TCAATGGACA	ATGCACGTTT	GGCTATTGCA
TCGATAGGAA	AGCTCATGTT	TGCTCAATTC	AGTGAGCTTG	TAAATGACTT	CTACAACAAT
GGGTTGCCAT	CAAATCTCAC	GGCTGGTAGG	AATCCAAGCT	TGGATTATGG	CTTCAAGGGA
GCTGAAATTG	CAATGGCTTC	TTACTGTTCT	GAGCTCCAAT	ATCTTGCAAA	TCCAGTAACT
AGCCATGTAC	AAAGTGCAGA	GCAGCACAAT	CAAGATGTGA	ACTCATTGGG	GCTAATCTCT
TCAAGAAAGA	CAGAAGAAGC	CGTAGATATC	TTGAAGCTCA	TGTCCACAAC	TTTCTTAGTA
GCACTTTGCC	AAGCTATTGA	CTTGAGACAT	TTGGAGGAGA	ATCTGAAGCA	CGCAGTCAAA
AACACTGTAA	GCCAAGTAGC	TAAAAGGGTT	CTAACTACGG	GTGCTACTGG	AGAACTTCAC
CCATCAAGGT	TCTGCGAGAA	GGACATGCTC	AAAGTTGTGG	ATTGTGAGCA	AGTCTTTTCC
TATATAGATG	ACCCCTGCAG	TGCTACCTAT	CCATTGATGC	AAAAACTGAG	GC

รูปที่ 14 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAL* บริเวณส่วนกลางยีน ขนาด 1,372 นิวคลีโอไทด์

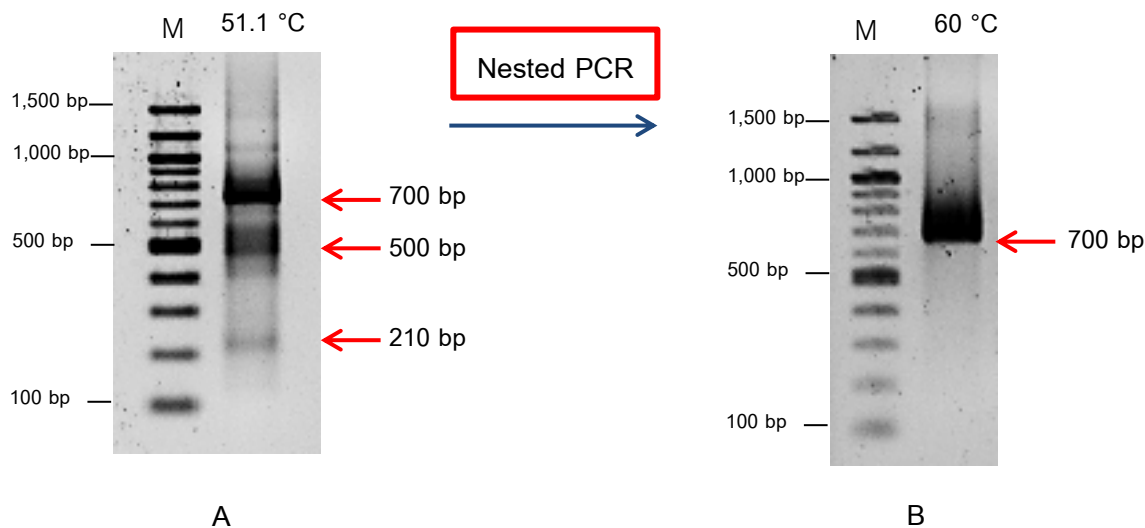
ตารางที่ 3 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PAL จากบริเวณส่วนเปลือกของยางพารากับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม nucleotide blast

Accession number	พืช	ชื่อยีน	% Identity score
AF383152.1	<i>Manihot esculenta</i>	<i>phenylalanine ammonia-lyase 2 (PAL2) gene</i>	94
KF311063.1	<i>Ricinus communis</i>	<i>phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene</i>	88
DQ883805.1	<i>Jatropha curcas</i>	<i>phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene</i>	86
AY860427.2	<i>Rhizophora mangle</i>	<i>phenylalanine ammonia-lyase 2 (PAL2) gene</i>	85
FJ197127.1	<i>Garcinia mangostana</i>	<i>phenylalanine ammonia-lyase (PAL) gene</i>	82
EF192469.1	<i>Vitis vinifera</i>	<i>phenylalanine ammonia-lyase (PAL) gene</i>	81
KC287085.1	<i>Rhus chinensis</i>	<i>phenylalanine ammonia-lyase (PAL) gene</i>	81
KP742840.1	<i>Citrus reticulata</i>	<i>phenylalanine ammonia-lyase (PAL) gene</i>	81
D26596.1	<i>Camellia sinensis</i>	<i>phenylalanine ammonia-lyase (PAL) gene</i>	80

## 1.2 การหาลำดับเบสของยีน *PAL* เส้นสมบูรณ์ (full-length) โดยใช้วิธี Rapid Amplification cDNA Ends (RACE)

### 1.2.1 การสังเคราะห์ยีน *PAL* ด้านปลาย 3'

ทำการสังเคราะห์ยีน *PAL* ด้านปลาย 3' และด้านปลาย 5' โดยใช้เทคนิค Rapid Amplification cDNA Ends (RACE) เริ่มจากการโคลนยีนด้านปลาย 3' โดยทำการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR แบบ nested PCR ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่มี 2 ขั้นตอน ขั้นตอนที่ 1 ทำ 3' RACE PCR โดยการใช้ B26 primer ซึ่งมี Oligo dT ที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ ร่วมกับการใช้ specific primer แบบ forward ซึ่งออกแบบจากส่วนของยีน *PAL* ที่โคลนได้จากข้อ 1.1 คือ PAL\_SF2 primer ผลจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขั้นตอนแรก ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 และ 700 นิวคลีโอไทด์ เมื่อใช้อุณหภูมิในขั้นตอนของ annealing ที่ 51.1 องศาเซลเซียส (รูปที่ 15A) เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ในขั้นตอนแรกที่มีขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ต้องการมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขั้นตอนที่ 2 ด้วยไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสเหมือนกับไพรเมอร์ B26 แต่ไม่มี ส่วนของ Oligo dT ที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ คือ B25 primer ร่วมกับการใช้ specific primer แบบ forward ซึ่งออกแบบจากส่วนของยีน *PAL* ที่โคลนได้จากข้อ 1.1 คือ PAL\_SF3 primer ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ทำการเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ผลจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขั้นตอนที่ 2 พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 นิวคลีโอไทด์ เมื่อใช้อุณหภูมิในขั้นตอนของ annealing ที่ 60 องศาเซลเซียส (รูปที่ 15B) ทำการสกัดแยกดีเอ็นเอของยีน *PAL* ด้านปลาย 3' ออกจากเจล และการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ โดยใช้ E.Z.N.A.<sup>®</sup> Gel Extraction Kit



**รูปที่ 15** ผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์จากการทำ 3' RACE PCR ในการสังเคราะห์ยีนด้านปลาย 3'

- A) การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขั้นตอนแรกโดยใช้อุณหภูมิในขั้นตอนของ annealing ที่ 51.1 องศาเซลเซียส
- B) การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขั้นตอนของ nested PCR โดยใช้อุณหภูมิในขั้นตอนของ annealing ที่ 60 องศาเซลเซียส

เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler 100 bp DNA Ladder

จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAL* ด้านปลาย 3' ที่ได้ พบว่ามีขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAL* เท่ากับ 658 นิวคลีโอไทด์ และพบ poly A tail บริเวณ 3' untranslated region จำนวน 143 นิวคลีโอไทด์ จากบริเวณรหัสหยุด (stop codon) คือ TAA (รูปที่ 16) เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม nucleotide blast พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAL* มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) สูงที่สุด 89 เปอร์เซ็นต์ โกงกางใบใหญ่ (*Rhizophora mangle*) 82 เปอร์เซ็นต์ โกโก้ (*Theobroma cacao*) 81 เปอร์เซ็นต์ ลิ้นจี่ (*Litchi chinensis*) 80 เปอร์เซ็นต์ และส้มแมนดาริน (*Citrus reticulata*) 80 เปอร์เซ็นต์

```

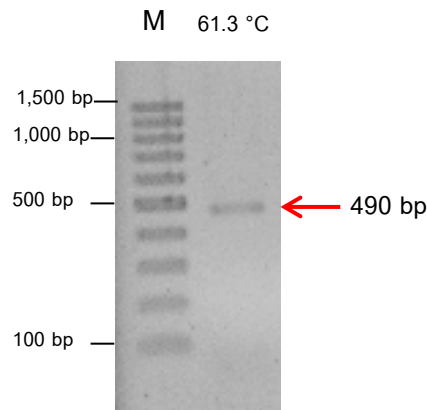
GGTTCTAACT ACGGGTGCTA CTGGGAGAAC TTCACCCATC AAGGTTCTGC GAGAAGGACA
TGCTCAAAGT TGTGGATTGT GAGCAAGTCT TTTCTTATAT AGATGACCCC TGCAGTGCTA
CCTATCCATT GATGCAAAAA CTAAGGCAAG TTCTCGTGGA CCATGCTTTG GCAAATGGTG
AGAATGAGAA GAATGCCAGC ACTTCAGTCT TCCAAAAGAT TGAAGCTTTC GAGGAAGAAC
TGAAAGCCCA TTTGCCTAAA CAAGTTGAGA GTGCAAGAGA GGCGCACGAG AGTGGGAATC
CAGCAGTTGC CAACAAGATC AAAGAATGCA GGTCTTACCC ATTGCACAAG TTTGTGAGGG
AGGAGTTAGG AACTGGGTTG CTCACTGGTG AGAAGGTCCG GTCACCTGGA GAGGAATTTG
ATAAGGTTTT CACCGCCATG TGCCAGGGAA AGATCATTGA TCCAATGCTA GATTGTCTCA
AGGAATGGAA TGGTGCCCTT CTTCCAATCT GTTAAAGCTGT AACTTTTTTGT TCTGTTTACA
TTTCAAGATT TGTTTTTCAA TCCCTTTTTTA TGTACCTATA GTTACAGTTT GTGATATAAA
AACAAAAATC TGTAATGCAT TTCTTTCAAT GTTCAGTAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAA

```

**รูปที่ 16** แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAL* ด้านปลาย 3' ขนาด 658 นิวคลีโอไทด์โดยมีรหัสหยุด (stop codon) คือ TAA

### 1.2.2 การสังเคราะห์ยีน *PAL* ด้านปลาย 5'

จากการโคลนยีน *PAL* บริเวณปลาย 5' โดยวิธี 5' RACE ไม่สามารถทำได้สำเร็จ จึงต้องทำการโคลนยีน *PAL* ด้านปลาย 5' โดยการใช้ degenerate primer ที่ออกแบบจากมันสำปะหลังและสับปะรด เนื่องจากมีลำดับเบสที่ค่อนข้างคล้ายกับยางพาราซึ่งเป็นพืชในตระกูลเดียวกัน ไพรมเมอร์ที่จำเพาะกับส่วนบริเวณปลาย 5' ของยีน *PAL* จากการทำ Alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAL* คือ PAL\_F2 primer ร่วมกับ PAL\_R1 primer (ตารางที่ 3) นำมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์หาอุณหภูมิที่เหมาะสม ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ทำการเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานโดยอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ของไพรมเมอร์ คือ อุณหภูมิ 61.3 องศาเซลเซียส (รูปที่ 17) หลังจากนั้นทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ปกติใช้อุณหภูมิในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของ annealing ที่อุณหภูมิ 61.3 องศาเซลเซียส ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ทำการเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานอีกครั้ง ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ โดยส่งตัวอย่าง PCR ในรูปแบบ unpurified เพื่อวิเคราะห์หา ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAL* ในส่วนของปลาย 5'



**รูปที่ 17** ผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการสังเคราะห์ยีน *PAL* ด้านปลาย 5' ของยางพาราที่อุณหภูมิ 61.3 องศาเซลเซียสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler 100 bp DNA Ladder (M)

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้โดยส่งตัวอย่าง PCR ในรูปแบบ unpurified เพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAL* ในส่วนของปลาย 5' วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ Universal primer คือ PAL\_F2 primer และ PAL\_R1 primer พบว่ามีขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAL* เท่ากับ 444 นิวคลีโอไทด์ที่มีบริเวณส่วนของรหัสเริ่มต้น (Start codon) คือ ATG (รูปที่ 18) เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAL* ด้านปลาย 5' กับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนกับยีนของมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) 91 เปอร์เซ็นต์ สบู่ดำ (*Jatropha curcas*) 89 เปอร์เซ็นต์ ฝ้าย (*Gossypium hirsutum*) 80 เปอร์เซ็นต์ และโรบีเนียดอกขาว (*Robinia pseudoacacia*) 77 เปอร์เซ็นต์

```
GGGGGGTTCC TGACGATAAG ACCACTGACT TTTTGGCTGG GGGGTAAAA AATGAATGGC
AGCCATTTAG ATGAAGTTAA AAGAATGGTG GCTGAGTTTA GGAAGCCTTT GGTCAAGTTA
GGCGGCGAAA CCTTGACCGT AGCTCAGGTG GCAGCTATTG CCAGCAGTCG TGAATCTGAT
GTGAAGGTGG AGCTTGCAGA ATCTGCTAGA GCTGGTGTTA AGGCAAGCAG TGACTGGGTC
ATGGATAGTA TGAACGAGGG AACTGATAGC TATGGTGTCA CCACTGGATT TGGGGCTACT
TCCCATAGAA GAACCAAGCA AGGTGGTGCT TTACAGAGGG AGCTCATTAG ATTCTTGAAT
GCTGGGATTT TTGGCAATAA CACAGAATCA TGTCACACTT TGTCACACTC TGCAACAAGA
GCAGCTATGC TAGTGGAGGA TCAA
```

**รูปที่ 18** แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAL* ด้านปลาย 5' ของยางพารา ขนาด 444 นิวคลีโอไทด์ที่มีบริเวณส่วนของรหัสเริ่มต้น (start codon) คือ ATG



### 1.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAL* full length ของยางพารา

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เส้นสมบูรณ์ของยีน *PAL* จากยางพารา พบว่า ยีน *PAL* มีขนาด (Open reading frame) 2,145 คู่เบส ประกอบด้วยบริเวณส่วนของ 5' ULR จำนวน 55 นิวคลีโอไทด์ ก่อนหน้าบริเวณรหัสเริ่มต้น และบริเวณส่วนของ 3' ULR จำนวน 143 นิวคลีโอไทด์ จากบริเวณรหัสหยุด แปลรหัสเป็นโปรตีนได้ขนาด 721 กรดอะมิโน (รูปที่ 19) เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน *PAL* ของยางพาราไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนพืชชนิดอื่นๆ จากฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม ClustalX 2.1 และโปรแกรม GeneDoc ได้แก่ สนุ่นดำ (*Jatropha curcas*, XP\_012082374.1) มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*, AAK60275.1) กระจับปี่ (*Ricinus communis*, XP\_002519521.1) โกโก้ (*Theobroma cacao*, XP\_007027354.1) พุทราจีน (*Ziziphus jujube*, XP\_015899784.1) ถั่วเหลือง (*Glycine max*, XP\_003554382.1) และองุ่น (*Vitis vinifera*, XP\_002267953.1) (รูปที่ 20) นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์หน้าที่ของโปรตีนพบบริเวณ motif ของเอนไซม์ Phenylalanine และ Histidine ammonia-lyase ในช่วงกรดอะมิโน (domain) ที่ 195-210 (GTITASGDLVPLSYIA) ซึ่งเป็นบริเวณตำแหน่งเดียวกันกับบริเวณอนุรักษ์ MIO motif ของกรดอะมิโน Ala-Ser-Gly ในช่วงกรดอะมิโนที่ 200-202 โดยทั้งสองช่วงบริเวณของกรดอะมิโนมีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของโปรตีน *PAL* ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีน *HbPAL* มีหน้าที่การทำงานที่คล้ายคลึงกับยีน *PAL* ในพืชอื่นๆ ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAL* ที่ได้กับฐานข้อมูลของ GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกับยีน *PAL* ของมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) 93 เปอร์เซ็นต์ สนุ่นดำ (*Jatropha curcas*) 86 เปอร์เซ็นต์ โกงกางใบใหญ่ (*Rhizophora mangle*) 83 เปอร์เซ็นต์ ลิ้นจี่ (*Litchi chinensis*) 81 เปอร์เซ็นต์ ถั่วเหลือง (*Glycine soja*) 81 เปอร์เซ็นต์ โรบิเนียดอกขาว (*Robinia pseudoacacia*) 80 เปอร์เซ็นต์ มังคุด (*Garcinia mangostana*) 80 เปอร์เซ็นต์ เชอร์รี่ป่า (*Prunus avium*) 80 เปอร์เซ็นต์ และองุ่น (*Vitis vinifera*) 80 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *HbPAL* จากกรดอะมิโน โดยการสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี neighborhood joining method เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของยีน *HbPAL* กับพืชอื่นๆ ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าโปรตีน *PAL* ในยางพารามีสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการคล้ายกับมันสำปะหลังมากที่สุด (รูปที่ 21)

```

1      gggggggtcctgacgataagaccactgactttttggctggggggttaaaaaatgaATGGC 382
1      M 1261
61     AACAAATTTCCCGGAATGGTCAACCAGAAATGGTCTTTGGAAACTTTGTGCGCAACTCGTGA 402
2     A T I S R N G H Q N G S L E T L C A T R 1321
121    CCCACTGAGTTGGGGTCTGGGCTGCTGAGTCAATGAATGGCAGCCATTTAGATGAAGTTAA 422
22     D P L S W G L A A E S M N G S H L D E V 1381
181    AAGAATGGTGGCTGAGTTAGGAAGCCCTTTGGTCAAGTTAGGGCGGCGAAACCCCTGACCCG 442
42     K R M V A E F R K P L V K L G G E T L T 1441
241    AGCTCAGGTGGCAGCTATTGCCAGCAGTCTGTGAATCTGTATGTGAAGTGGAGCTTGCGA 462
62     V A Q V A A I A S S R E S D V K V E L A 1501
301    ATCTGCTAGAGCTGGTGTAAAGCAAGCAGTGAATGGTCTCATGATAGTATGAACGAGGG 482
82     E S A R A G V K A S S D W V M D S M N E 1561
361    AACTGATAGTCTGGTCAACCACTGGATTGGGGGCTACTCCCATAGAAAGAACCAAGCA 502
102    GT D S Y G V T T G F G A T S H R R T K 1621
421    AGTGGTCTCTTACAGAGGAGCCATTAGATTCTTGAATGCTGGGATTTTTGGCAATAA 522
122    Q G G A L Q R E L I R F L N A G I F G N 1681
481    CACAGAAATCATGTCACACTTTGTCACTCTGCAACAAGAGCAGCTATGCTAGTGGGAT 542
142    N T E S C H T L S H S A T R A A M L V R 1740
541    CAACACTCTCCCTCCAGGTTACTCAGGCATTAGATTGAAATCTTGGAAAGCCATCACCAA 562
162    I N T L L Q G Y S G I R F E I L E A I T 1801
601    GCTCCCTCAACCAACACTTACTCCATGCTTGGCCGCTCCGAGGCAACAATCACTGCTCAGG 582
182    K L L N H N I T P C L P L R G T I T A S 1861
661    GSATTTAGTCCATTGTCATACATTGCTGGATTACTCACTGGCCGGCCCTAATCCCAAGGC 602
202    G D L V P L S Y I A G L L T G R P N S K 1921
721    TGTGGCCCCCAATGGGGAAATCCCTAGATGCCAGCAAGCCCTTCCGCTTGTGGTATTGA 622
222    A V G P N G E S L D A Q Q A F R F A G I 1981
781    CTCTGGCTCTTTGAGTTGCAGCCATAAGAGGCCCTTGTCTGGTAAATGGCACTGCACT 642
841    D S G F F E L Q P K E G L A L V N G T A 2041
262    TGGTCTGGCTGGCTCTATGCTTTCTTTTGGGCCAAATGTTCTTCTGCTTTTATCAGA 662
901    V G S G L A S M V L F E A N V L A V L S 2101
282    AGTTTTATCAGCAATTTTGGCAGAGGTTATGAATGGAAACCTGAATTTACTGATCACTT 682
961    E V L S A I F A E V M N G K P E F T D H 2161
302    GACACATAAATTAAGCATCATCCGGGGCAATAGAGGCTCAGCTATAATGGAGCACAT 702
1021  L T H K L K H H P G Q I E A A A I M E H 2221
322  TTTAGATGGTCTCTTATATTAAAGCAGCTAAGAAGTTGCATGAATGGATCCCTTGCA 2281
1081  I L D G S S Y I K A A K K L H E M D P L 2341
342  GAAACCAAGCAAGATCGATATGCTCTCAGGACTTCAACCAATGGCTAGGTCCCTCAGAT 2401
1141  Q K P K Q D R Y A L R T S P Q W L G P Q 2461
362  TGAAGTTATCAGATTTCCAACTAAATCAATCGAAAGAGAGATTAATTCAGTGAATGACAA 2521
1201  I E V I R F S T K S I E R E I N S V N D 2581
      CCCTTTGATGATGTTTCTAGGAAACAGGCCCTTACATGGTGGAAATTTCCAAAGGACCC 2641
      N P L I D V S R N K A L H G G N F Q G T
      GATTGGAGTCTCAATGGACAATGCACGTTTGGCTATTGCATCGATAGGAAAGCTCATGTT
      P I G V S M D N A R L A I A S I G K L M
      TGCTCAATTCAGTGAAGTSTAAATGACTTCTACAACAATGGGTGCCATCAAAATCTCAC
      F A Q F S E L V N D F Y N N G L P S N L
      GGCTGGTAGGAATCCAAAGCTTGGATTATGGCTTCAAGGGAGCTGAAATGGCAATGGCTTC
      T A G R N P S L D Y G F K G A E I A M A
      TTAAGTCTGAGTCCAAATCTTGCAAATCCAGTAACTAGCCATGTACAAAGTGCAGA
      S Y C S E L Q Y L A N P V T S H V Q S A
      GCAGCACAATCAAGATGTGAATCATTGGGGCTAATCTCTTCAAGAAAGACAGAGAGAGC
      E Q H N Q D V N S L G L I S S R K T E
      CGTAGATATCTTGAAGCTCATGTCACCAACTTCTTAGTAGCACTTTGCCAAGCTATTGA
      A V D I L K L M S T T F L V A L C Q A I
      CTTGAGACATTTGGAGSAGAACTGAAAGCAGCAGTCAAAACACTGTAAAGCCAGTAGC
      D L R H L E E N L K H A V K N T V S Q V
      TAAAGGGTCTAACTACGGGCTACTGGGAGAACTTCAACATCAAGTTCGGAGAA
      A K R V L T T G A T G R T S P S R F C E
      GGACATGCTCAAAGTGTGGATTGTGAGCAAGTCTTTTCCATATAGATGACCCCTGCAG
      K D M L K V V D C E Q V F S Y I D D P C
      TGCTACCTATCCATTGATGCAAAAACTAAGGCAAGTCTCTGGGACCATGCTTTGGCAAA
      S A T Y P L M Q K L R Q V L V D H A L A
      TGGTGAAGATGAGAAGATGCCAGCATTCAGTCTTCCAAAAGATTGAAGCTTTCCAGGA
      N G E N E K N A S T S V F Q K I E A F E
      AGAATGAAAGCCCATTTGCTAAACAAGTTGAGAGTGCAGAGAGAGGCCAAGAGAGTGG
      E E L K A H L P K Q V E S A R E A H E S
      GAATCCAGCAGTGCACAACAAGATCAAGAAATGCAGGTCTTACCCATGCAACAAGTTGT
      G N P A V A N K I K E C R S Y P L H K F
      GAGGAGGAGTGGAGTGGTGTCTCAGTGGTGAAGGTCGGGTCACCTGGAGAGGA
      V R E E L G T G L L T G E K V R S P G E
      ATTTGATAAGSTTTTCAAGCCATGTGCCAGGAAAGATCATGATCCAAATGCTAGATTG
      E F D K V F T A M C Q G K I I D P M L D
      TCTCAGGAAATGGAATGGTGGCCCTCTTCCAACTGTGTTAAAGTGTAACTTTTGTCTgt
      C L K E W N G A P L P I C *
      ttacatttcaagatttgttttccaatccccctttttatgtacctatagttacagtttgtgat
      atatacaaaaaaaatctgtaatgctatttcttcaatgttgcagtaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
      aaa

```

รูปที่ 19 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PAL (ORF) ขนาด 2,145 คู่เบส ที่ประกอบด้วยบริเวณ  
 ประกอบด้วยบริเวณส่วนของ 5' ULR จำนวน 55 นิวคลีโอไทด์ ก่อนหน้าบริเวณรหัสเริ่มต้น  
 คือ ATG และบริเวณส่วนของ 3' ULR จำนวน 143 นิวคลีโอไทด์ จากบริเวณรหัสหยุด คือ  
 TAA และแปลรหัสเป็นโปรตีนได้ขนาด 721 กรดอะมิโน

```

Hevea : MAATSRNCHQNGS---DEMLCAT-----RDPIWGLAABESMGSHLDEVKRMVAEYRKPPIVALGGETLTVAGVAATASSRESVDKVEITSEARAG : 87
Vitis : MEAMNCHGSRK---VEGFVVS-----DPIWNGVAABALRGSHLDEVKRMVAEYRKPPIVALGGETLTVAGVAATAAG--REEDVSVELSEARAG : 83
Manihot : MAATSRNCHQNGS---HDSICTA-----RDPIWGLAABESMGSHLDEVKRMVAEYRKPPIVALGGETLTVAGVAATA--RESGCVETSEARAG : 85
Jatropha : MATIICGNCHQNGS---DEGLCIT-----RDPIWNGVAABESMGSHLDEVKRMVAEYRKPPIVALGGETLTVAGVAATA--HDAGVKVETSEARAG : 86
Ricinus : MAAMAENGRNDS---DESFQNMG-----RDPIWGLAABESMGSHLDEVKRMVAEYRKPPIVALGGETLTVAGVAATA--HDCCVKVETSEARAG : 87
Theobrcma : METIACGNCHQNGS---DESFCTASTATKAVVDPINWGAATAEALRGSHLDEVKRMVAEYRKPPIVALGGETLTVAGVAATA--RDLCVKVETSEARAG : 95
Ziziphus : MAAVTGNCHQNGS---DESFCKT-----TDPIGWMAABESMGSHLDEVKRMVAEYRKPPIVALGGETLTVAGVAATA--SGSSVKVETSEARAG : 90
Glycine : MEAT--NCHQNGS---FCLSTRG-----SDPINWGAATAEALRGSHLDEVKRMVAEYRKPPIVALGGETLTVAGVAATA--GHDHCVETSEARAG : 85
M          ng qngs          e c          DPL Wg aAEs6 GSHLDEVK4Mvae5RKP V LGGETLT6 QVA6A 6 VEL E ARAG

```

```

Hevea : VFASSFWWMDSMKCTDSYGVTTGFGATSHRRTKQCALQELIRFLNAGIFGNTESEHTTISHSAARAAMLVLRINLLQCVSGIRFEILEAITKLLNHN : 187
Vitis : VFASSFWWMDSMKCTDSYGVTTGFGATSHRRTKQCALQELIRFLNAGIFGNTESEHTTISHSAARAAMLVLRINLLQCVSGIRFEILEAITKLLNHN : 183
Manihot : VFASSFWWMDSMKCTDSYGVTTGFGATSHRRTKQCALQELIRFLNAGIFGNTESEHTTISHSAARAAMLVLRINLLQCVSGIRFEILEAITKLLNHN : 185
Jatropha : VFASSFWWMDSMKCTDSYGVTTGFGATSHRRTKQCALQELIRFLNAGIFGNTESEHTTISHSAARAAMLVLRINLLQCVSGIRFEILEAITKLLNHN : 186
Ricinus : VFASSFWWMDSMKCTDSYGVTTGFGATSHRRTKQCALQELIRFLNAGIFGNTESEHTTISHSAARAAMLVLRINLLQCVSGIRFEILEAITKLLNHN : 187
Theobrcma : VFASSFWWMDSMKCTDSYGVTTGFGATSHRRTKQCALQELIRFLNAGIFGNTESEHTTISHSAARAAMLVLRINLLQCVSGIRFEILEAITKLLNHN : 195
Ziziphus : VFASSFWWMDSMKCTDSYGVTTGFGATSHRRTKQCALQELIRFLNAGIFGNTESEHTTISHSAARAAMLVLRINLLQCVSGIRFEILEAITKLLNHN : 190
Glycine : VFASSFWWMDSMKCTDSYGVTTGFGATSHRRTKQCALQELIRFLNAGIFGNTESEHTTISHSAARAAMLVLRINLLQCVSGIRFEILEAITKLLNHN : 185
VFASSdWv6 sMnkGTDsYGVTTGFGATSHRRTKQg ALQ4ELIRFLNAGIFGNtE3cHTTlph3AtrAAMLVLRINLLQCVSGIRFEILEAITKLLNHN

```

```

Hevea : ITPCPLRLRGTITASCDLVPLSYIAGLLTGRENSKAVCHGSESLDAQARFAGIISGFFELQPKREGLAVNGTAVGSGGLASMLVFEPANLAVLSELSAI : 287
Vitis : ITPCPLRLRGTITASCDLVPLSYIAGLLTGRENSKAVCHGSESLDAQARFAGIISGFFELQPKREGLAVNGTAVGSGGLASMLVFEPANLAVLSELSAI : 283
Manihot : ITPCPLRLRGTITASCDLVPLSYIAGLLTGRENSKAVCHGSESLDAQARFAGIISGFFELQPKREGLAVNGTAVGSGGLASMLVFEPANLAVLSELSAI : 285
Jatropha : ITPCPLRLRGTITASCDLVPLSYIAGLLTGRENSKAVCHGSESLDAQARFAGIISGFFELQPKREGLAVNGTAVGSGGLASMLVFEPANLAVLSELSAI : 286
Ricinus : ITPCPLRLRGTITASCDLVPLSYIAGLLTGRENSKAVCHGSESLDAQARFAGIISGFFELQPKREGLAVNGTAVGSGGLASMLVFEPANLAVLSELSAI : 287
Theobrcma : ITPCPLRLRGTITASCDLVPLSYIAGLLTGRENSKAVCHGSESLDAQARFAGIISGFFELQPKREGLAVNGTAVGSGGLASMLVFEPANLAVLSELSAI : 295
Ziziphus : ITPCPLRLRGTITASCDLVPLSYIAGLLTGRENSKAVCHGSESLDAQARFAGIISGFFELQPKREGLAVNGTAVGSGGLASMLVFEPANLAVLSELSAI : 290
Glycine : VTPCPLRLRGTITASCDLVPLSYIAGLLTGRENSKAVCHGSESLDAQARFAGIISGFFELQPKREGLAVNGTAVGSGGLASMLVFEPANLAVLSELSAI : 285
6TPCPLRLRGTITASCDLVPLSYIAGLLTGRpNSKA6GF GE 61A 2AF AgI 3GFpELQPKREGLAVNGTAVGSGGLASMLVFEPANLAVLSE6LSAI

```

**บริเวณอนุรักษ์ Phenylalanine/ histidine ammonia-lyase**

```

Hevea : FAEVMNGKPEPTDHLTHLKHHPGQIEAAAIMEHILIGSSYVRAAKLHEMDPLQPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRFSTKSIEREINSVNDNPLIDV : 387
Vitis : FAEVMNGKPEPTDHLTHLKHHPGQIEAAAIMEHILIGSSYVRAAKLHEMDPLQPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRFSTKSIEREINSVNDNPLIDV : 383
Manihot : FAEVMNGKPEPTDHLTHLKHHPGQIEAAAIMEHILIGSSYVRAAKLHEMDPLQPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRFSTKSIEREINSVNDNPLIDV : 385
Jatropha : FAEVMNGKPEPTDHLTHLKHHPGQIEAAAIMEHILIGSSYVRAAKLHEMDPLQPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRFSTKSIEREINSVNDNPLIDV : 386
Ricinus : FAEVMNGKPEPTDHLTHLKHHPGQIEAAAIMEHILIGSSYVRAAKLHEMDPLQPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRFSTKSIEREINSVNDNPLIDV : 387
Theobrcma : FAEVMNGKPEPTDHLTHLKHHPGQIEAAAIMEHILIGSSYVRAAKLHEMDPLQPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRFSTKSIEREINSVNDNPLIDV : 395
Ziziphus : FAEVMNGKPEPTDHLTHLKHHPGQIEAAAIMEHILIGSSYVRAAKLHEMDPLQPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRFSTKSIEREINSVNDNPLIDV : 390
Glycine : FAEVMNGKPEPTDHLTHLKHHPGQIEAAAIMEHILIGSSYVRAAKLHEMDPLQPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRFSTKSIEREINSVNDNPLIDV : 385
FAEVM NGKPEPTDHLTHLKHHPGQIEAAAIMEHILIGSSYV6aAKLHE6DPLQPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIR sTKSIEREINSVNDNPLIDV

```

```

Hevea : SRNKALHGGNFQCTPIGVSMDNRLALATASIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLTAGRNPSLDYGFKGAETAMASYCSELQYLANPVTSHVCSAEQHND : 487
Vitis : SRNKALHGGNFQCTPIGVSMDNRLALATASIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLTAGRNPSLDYGFKGAETAMASYCSELQYLANPVTSHVCSAEQHND : 483
Manihot : SRNKALHGGNFQCTPIGVSMDNRLALATASIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLTAGRNPSLDYGFKGAETAMASYCSELQYLANPVTSHVCSAEQHND : 485
Jatropha : SRNKALHGGNFQCTPIGVSMDNRLALATASIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLTAGRNPSLDYGFKGAETAMASYCSELQYLANPVTSHVCSAEQHND : 486
Ricinus : SRNKALHGGNFQCTPIGVSMDNRLALATASIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLTAGRNPSLDYGFKGAETAMASYCSELQYLANPVTSHVCSAEQHND : 487
Theobrcma : SRNKALHGGNFQCTPIGVSMDNRLALATASIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLTAGRNPSLDYGFKGAETAMASYCSELQYLANPVTSHVCSAEQHND : 495
Ziziphus : SRNKALHGGNFQCTPIGVSMDNRLALATASIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLTAGRNPSLDYGFKGAETAMASYCSELQYLANPVTSHVCSAEQHND : 490
Glycine : SRNKALHGGNFQCTPIGVSMDNRLALATASIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLTAGRNPSLDYGFKGAETAMASYCSELQYLANPVTSHVCSAEQHND : 485
SRNKALHGGNFQCTPIGVSMDN RLALATASIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLTAGRNPSLDYGFKGAETAMASYCSELQ5LANPVTSHVCSAEQHND

```

```

Hevea : VNSLGLISSRRTAEAVDILKLMSTTYLVALCCAIDLRLHEENLRHAKVNTVSGVAKRVLITGANGELHPSRFCEKDLLKVVDRBVFVADDDCSATYPL : 587
Vitis : VNSLGLISSRRTAEAVDILKLMSTTYLVALCCAIDLRLHEENLRHAKVNTVSGVAKRVLITGANGELHPSRFCEKDLLKVVDRBVFVADDDCSATYPL : 583
Manihot : VNSLGLISSRRTAEAVDILKLMSTTYLVALCCAIDLRLHEENLRHAKVNTVSGVAKRVLITGANGELHPSRFCEKDLLKVVDRBVFVADDDCSATYPL : 585
Jatropha : VNSLGLISSRRTAEAVDILKLMSTTYLVALCCAIDLRLHEENLRHAKVNTVSGVAKRVLITGANGELHPSRFCEKDLLKVVDRBVFVADDDCSATYPL : 586
Ricinus : VNSLGLISSRRTAEAVDILKLMSTTYLVALCCAIDLRLHEENLRHAKVNTVSGVAKRVLITGANGELHPSRFCEKDLLKVVDRBVFVADDDCSATYPL : 587
Theobrcma : VNSLGLISSRRTAEAVDILKLMSTTYLVALCCAIDLRLHEENLRHAKVNTVSGVAKRVLITGANGELHPSRFCEKDLLKVVDRBVFVADDDCSATYPL : 595
Ziziphus : VNSLGLISSRRTAEAVDILKLMSTTYLVALCCAIDLRLHEENLRHAKVNTVSGVAKRVLITGANGELHPSRFCEKDLLKVVDRBVFVADDDCSATYPL : 590
Glycine : VNSLGLISSRRTAEAVDILKLMSTTYLVALCCAIDLRLHEENLRHAKVNTVSGVAKRVLITGANGELHPSRFCEKDLLKVVDRBVFVADDDCSATYPL : 585
VNSLGLISSRRT EA6dILKLMs3T5L6ALCQAIDLRLHEENL4 VKnTV3q6aK4 LttGanGelHPSRFceK6DLKVVDrE VF Y DDpCSATYPL

```

```

Hevea : MQKLRQVIVBALANGENKRNASTSVFQKTAPEEELKHALPKVEESARVHESGNPAANKIECRSYPLKRVREELGTLTGERVSPGEEPRDFVF : 687
Vitis : MQKLRQVIVBALANGENKRNASTSVFQKTAPEEELKHALPKVEESARVHESGNPAANKIECRSYPLKRVREELGTLTGERVSPGEEPRDFVF : 683
Manihot : MQKLRQVIVBALANGENKRNASTSVFQKTAPEEELKHALPKVEESARVHESGNPAANKIECRSYPLKRVREELGTLTGERVSPGEEPRDFVF : 685
Jatropha : MQKLRQVIVBALANGENKRNASTSVFQKTAPEEELKHALPKVEESARVHESGNPAANKIECRSYPLKRVREELGTLTGERVSPGEEPRDFVF : 686
Ricinus : MQKLRQVIVBALANGENKRNASTSVFQKTAPEEELKHALPKVEESARVHESGNPAANKIECRSYPLKRVREELGTLTGERVSPGEEPRDFVF : 687
Theobrcma : MQKLRQVIVBALANGENKRNASTSVFQKTAPEEELKHALPKVEESARVHESGNPAANKIECRSYPLKRVREELGTLTGERVSPGEEPRDFVF : 695
Ziziphus : MQKLRQVIVBALANGENKRNASTSVFQKTAPEEELKHALPKVEESARVHESGNPAANKIECRSYPLKRVREELGTLTGERVSPGEEPRDFVF : 690
Glycine : MQKLRQVIVBALANGENKRNASTSVFQKTAPEEELKHALPKVEESARVHESGNPAANKIECRSYPLKRVREELGTLTGERVSPGEEPRDFVF : 685
MQKLRQ6IV HAL NgEnER1 sT86FQK6 aFEELK LPK2Eaar aEs6n a N4IECRSYPLKRVRE6G3GLTGeK6 SPGEePdk6F

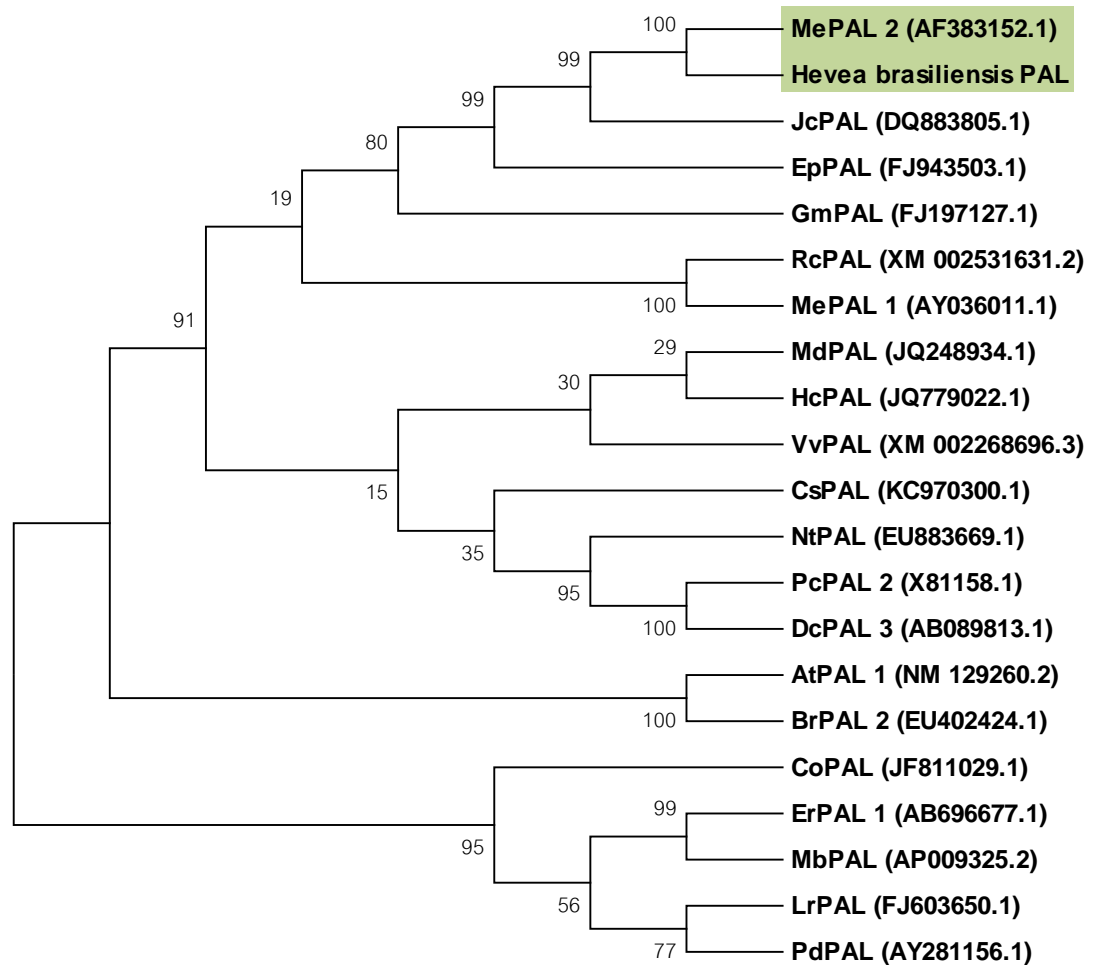
```

```

Hevea : TAMCQKIIDPMDCLKEWNGAPLPIG : 714
Vitis : TAMCEKIIDPLDCLSEWNGAPLPIG : 710
Manihot : TAMCQKIIDPMDCLKEWNGAPLPIG : 712
Jatropha : TAMCEKIIDPMDCLKEWNGAPLPIG : 713
Ricinus : TAMCQKIIDPMDCLKEWNGAPLPIG : 714
Theobrcma : TAMCQKIIDPMDCLKEWNGAPLPIG : 722
Ziziphus : TAMCQKIIDPMDCLSEWNGAPLPIG : 717
Glycine : TAMCQKIIDPLDCLKEWNGAPLPIG : 712
TAMC2GKIIDP66 CL eWNGAPLP6C

```

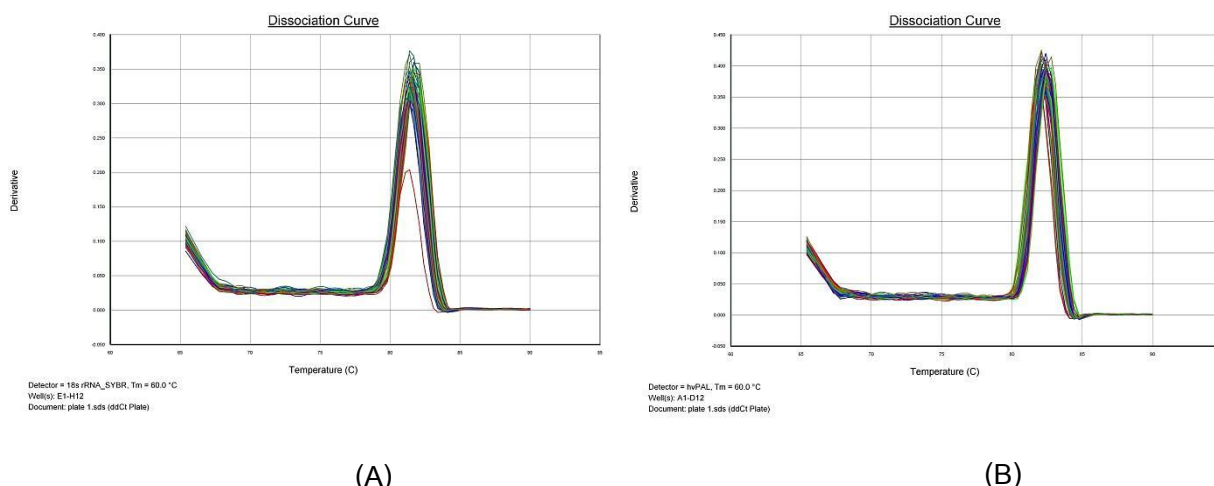
**รูปที่ 20** การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนโปรตีน PAL ของยางพารากับพืชชนิดอื่นๆ ที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม GeneDoc



**รูปที่ 21** แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของโปรตีน PAL จากยางพารา (*Hevea brasiliensis*) กับโปรตีน PAL ในพืชอื่นๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม MEGA 6 ตัวเลขบนแขนง (node) แสดงเปอร์เซ็นต์ความน่าเชื่อถือจากการคำนวณด้วย Bootstrap root test จำนวน 1,000 รอบ

## 2. การแสดงออกของยีน *PAL* ในยางพาราที่ทำการติดตามโดยใช้เทคนิค quantitative real time PCR (qRT-PCR)

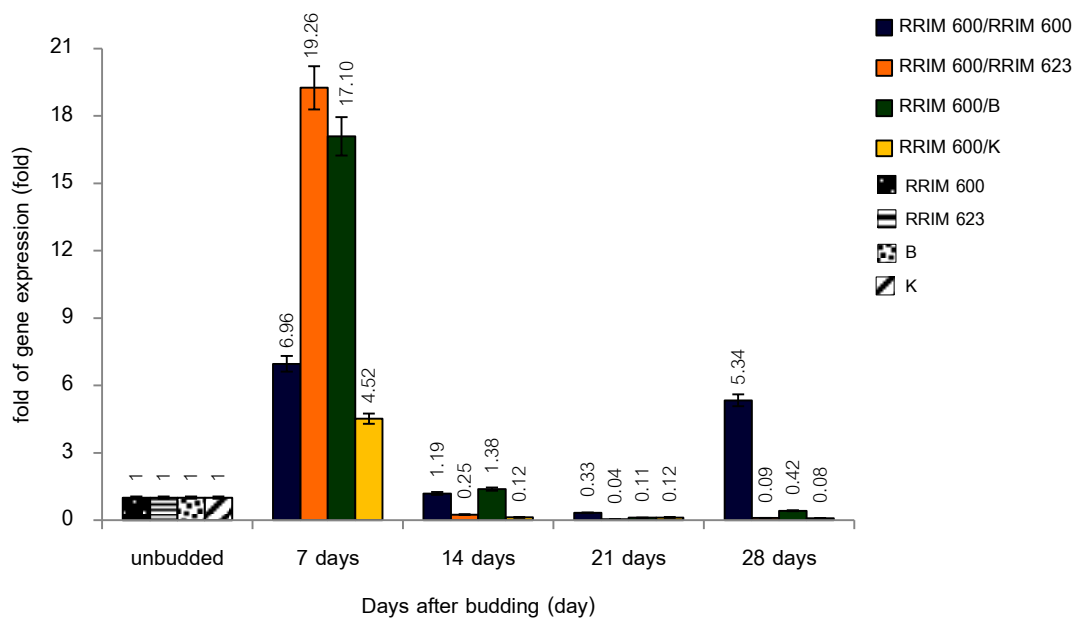
การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *PAL* ใช้ไพรเมอร์ที่ผ่านการตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงมาแล้ว ได้แก่ query\_F3 primer และ query\_R3 primer (รูปที่ 22) มาใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *PAL* บริเวณแผ่นตา และรอยต่อระหว่างแผ่นตากับส่วนเนื้อเยื่อของต้นตอที่ทำการติดตามระหว่างต้นตอพันธุ์ RRIM 623 พันธุ์พื้นเมืองบางรัก (B) พันธุ์พื้นเมืองควนמדแดง (K) พันธุ์ RRIM 600 และพันธุ์ RRIT 251 กับกิ่งตอพันธุ์ดี ได้แก่ พันธุ์ RRIM 600 และพันธุ์ RRIT 251 หลังจากทำการติดตาม 7 วัน, 14 วัน, 21 วัน 28 วัน และที่ไม่ได้ทำการติดตาม นำมาสกัดอาร์เอ็นเอสำหรับการสังเคราะห์ cDNA เพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *HbPAL* และใช้ยีน 18s rRNA เป็นยีนอ้างอิง



**รูปที่ 22** ผลการตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ query\_F3 และ query\_R3 สำหรับนำมาใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน 18s rRNA (A) และยีน *PAL* (B) ด้วยเทคนิค qRT-PCR

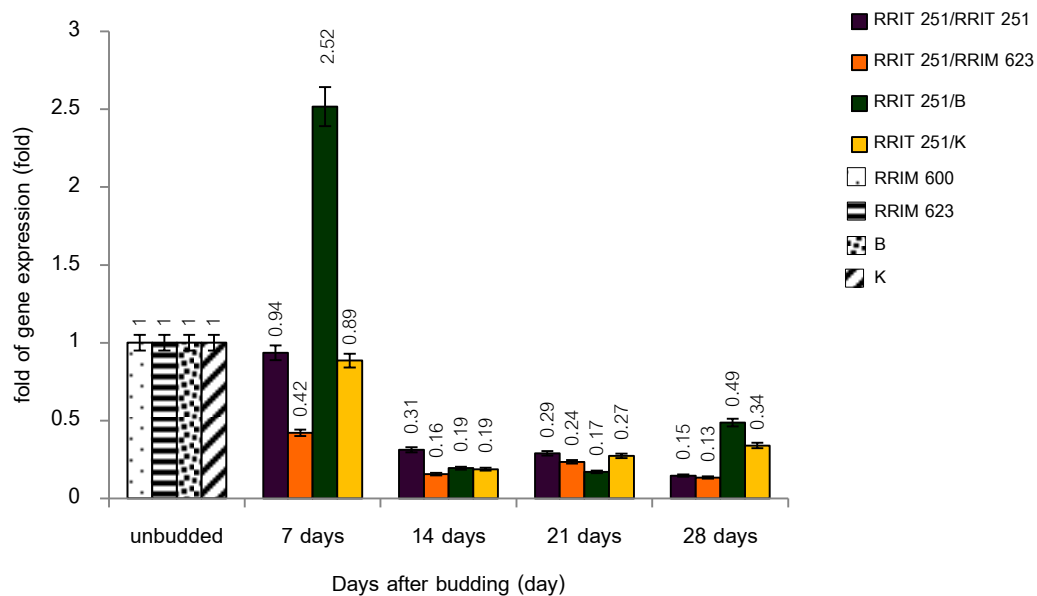
จากผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *HbPAL* ของต้นตอยางพาราพันธุ์ต่างๆ ที่ทำการติดตามด้วยกิ่งพันธุ์ดี พันธุ์ RRIM 600 (heterograft) และต้นตอยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ที่ทำการติดตามด้วยกิ่งพันธุ์ RRIM 600 (homograft) ทำการเปรียบเทียบกับต้นตอยางพาราพันธุ์ต่างๆ และพันธุ์ RRIM 600 ที่ไม่ได้ทำการติดตาม พบว่ามีระดับการแสดงออกของยีน *HbPAL* สูงที่สุดหลังจากทำการติดตาม

ไปแล้ว 7 วัน ในต้นตอทุกพันธุ์ (รูปที่ 23) โดยการแสดงออกของยีน *HbPAL* แสดงออกสูงสุดเมื่อติดตามต้นตอพันธุ์ RRIM 623 ตามด้วยพันธุ์พื้นเมืองบางรัก (B) พันธุ์ RRIM 600 และพันธุ์พื้นเมืองควนกรดแดง (K) เมื่อเปรียบเทียบกับต้นยางพาราพันธุ์ต่างๆ ที่ไม่ได้ทำการติดตาม นอกจากนี้ยังพบว่า หลังจากทำการติดตามไปแล้ว 28 วัน ต้นยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ที่ทำการติดตามด้วยตาของกิ่งพันธุ์ดี พันธุ์ RRIM 600 (homograft) มีระดับการแสดงออกของยีนที่เพิ่มสูงขึ้น เมื่อเทียบกับต้นตอพันธุ์พื้นเมือง ที่ทำการติดตามด้วยตาของกิ่งพันธุ์ดี พันธุ์ RRIM 600 (heterograft) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากปัจจัยภายนอกปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการแสดงออกของยีน ได้แก่ ปัจจัยการเข้าทำลายของเชื้อโรค โดยในวันที่ทำการเก็บตัวอย่างส่วนของเปลือกยางพาราที่ทำการติดตาม พบการเข้าทำลายของโรคราน้ำค้างที่เข้าทำลายในส่วนของใบอ่อนยางพารา ซึ่งอาจส่งผลให้ระดับการแสดงออกของยีน *HbPAL* สูงขึ้น



**รูปที่ 23** ระดับการแสดงออกของยีน *HbPAL* ในต้นยางพาราพันธุ์ต่างๆ ที่ทำการติดตามด้วยกิ่งพันธุ์ RRIM 600 (heterograft) และต้นตอพันธุ์ RRIM 600 ที่ทำการติดตามด้วยตาของกิ่งพันธุ์ RRIM 600 (homograft) ทำการเปรียบเทียบกับต้นยางพาราพันธุ์ต่างๆ และพันธุ์ RRIM 600 ที่ไม่ได้ทำการติดตาม บริเวณส่วนเปลือกที่เกิดรอยเชื่อมประสานกัน

เช่นเดียวกันกับในต้นตอยางพาราพันธุ์ต่างๆ ที่ทำการติดตามด้วยตาของกิ่งพันธุ์ RRIT 251 (heterograft) และต้นตอยางพันธุ์ RRIT 251 ที่ทำการติดตามด้วยตาของกิ่งพันธุ์ RRIT 251 (homograft) ทำการเปรียบเทียบกับต้นยางพาราพันธุ์ต่างๆ ที่ไม่ได้ทำการติดตาม พบว่ามีระดับการแสดงออกของยีน *HbPAL* สูงที่สุดหลังจากทำการติดตามไปแล้ว 7 วันในต้นตอทุกพันธุ์ (รูปที่ 24) โดยการแสดงออกของยีน *HbPAL* แสดงออกสูงสุดเมื่อติดตามต้นตอพันธุ์พื้นเมืองบางรัก (B) ตามด้วยพันธุ์พื้นเมืองควนמדแดง (K) พันธุ์ RRIT 251 และพันธุ์ RRIM 623 เมื่อเปรียบเทียบกับต้นยางพาราพันธุ์ต่างๆ ที่ไม่ได้ทำการติดตาม



**รูปที่ 24** ระดับการแสดงออกของยีน *HbPAL* ในต้นยางพาราพันธุ์ต่างๆ ที่ทำการติดตามด้วยกิ่งพันธุ์ RRIT 251 (heterograft) และต้นตอพันธุ์ RRIT 251 ที่ทำการติดตามด้วยกิ่งพันธุ์ RRIT 251 (homograft) ทำการเปรียบเทียบกับต้นยางพาราพันธุ์ต่างๆ และพันธุ์ RRIT 251 ที่ไม่ได้ทำการติดตาม บริเวณส่วนเปลือกที่เกิดรอยเชื่อมประสานกัน

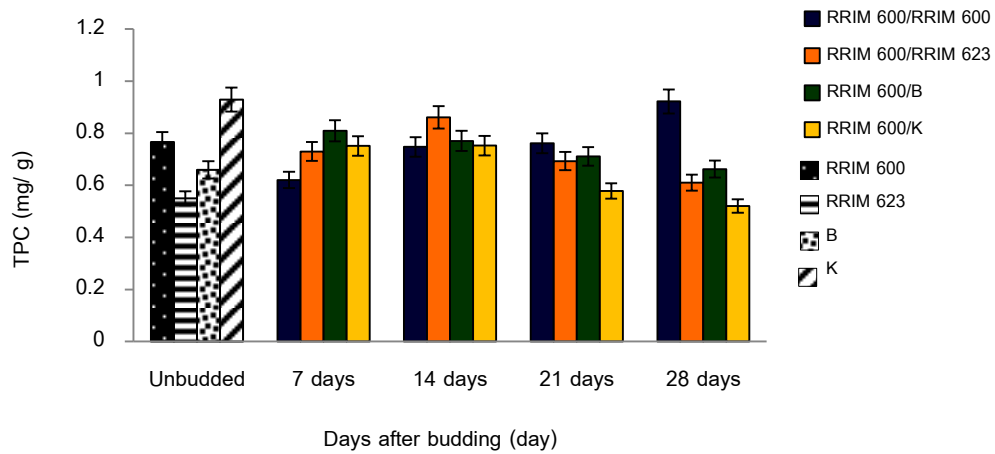
จากการแสดงออกของยีน *HbPAL* ของต้นตออย่างพาราพันธุ์ต่างๆ ที่ทำการติดตามกับกิ่งพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 พบว่าการแสดงออกของยีนที่มีการแสดงออกสูงที่สุดในวันที่ 7 หลังจากการติดตาม หลังจากนั้นระดับการแสดงออกของยีนจะเริ่มลดลงอย่างรวดเร็ว โดยต้นตออย่างพาราพันธุ์ต่างๆ ที่ติดต่อกับกิ่งพันธุ์ RRIM 600 มีระดับการแสดงออกของยีน *HbPAL* ในวันที่ 7 หลังจากการติดตามสูงกว่าในกิ่งพันธุ์ RRIT 251 แต่หลังจากติดตามไปแล้ว 21 วัน พบว่าต้นตออย่างพาราพันธุ์พื้นเมืองที่ทำการติดต่อกับกิ่งพันธุ์ RRIT 251 มีระดับการแสดงออกของยีน *HbPAL* ที่สูงกว่าในต้นตออย่างพาราพันธุ์พื้นเมืองที่ทำการติดต่อกับกิ่งพันธุ์ RRIM 600

### 3. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content; TPC) หลังจากการติดตาม

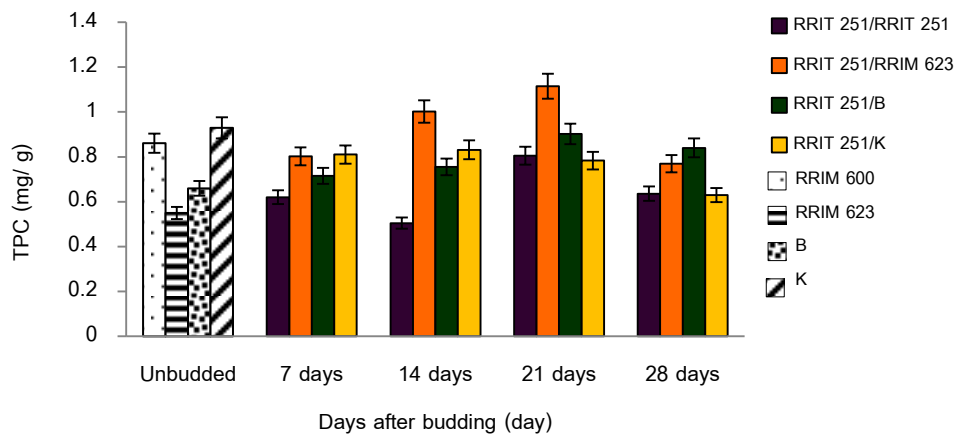
จากการเก็บตัวอย่างบริเวณส่วนเปลือกของอย่างพาราพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 ที่ติดตามบนต้นตอพันธุ์ต่างๆ คือ พันธุ์ RRIM 623 พันธุ์พื้นเมือง บางรัก (B) และ พันธุ์พื้นเมืองควนמדแดง (K) หลังจากทำการติดตาม 7 วัน, 14 วัน, 21 วัน และ 28 วัน โดยเก็บเปลือกตรงบริเวณแผ่นตา และ รอยต่อระหว่างแผ่นตากับส่วนเนื้อเยื่อของต้นตอ เพื่อนำมาสกัดหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้สารละลายเมทานอลความเข้มข้น 80% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยการเติมสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ 0.5 มิลลิลิตร ร่วมกับโพลินชิโอแคลทู รีเอเจนต์ 0.5 มิลลิลิตร

จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่เกิดขึ้นหลังจากการติดตามกิ่งพันธุ์ RRIM 600 และต้นตอพันธุ์ต่างๆ รวมทั้งต้นตอพันธุ์ RRIM 600 (homograft) และต้นตอพันธุ์ต่างๆ ที่ไม่ได้ทำการติดตาม พบว่าปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 25) เช่นเดียวกันกับการใช้กิ่งพันธุ์ RRIT 251 ติดตามบนต้นตอพันธุ์ต่างๆ รวมทั้งต้นตอพันธุ์ RRIT 251 (homograft) และต้นตอพันธุ์ RRIT 251 ที่ไม่ได้ทำการติดตาม พบว่าปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 26)





**รูปที่ 25** ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mg/g) ในต้นตอยางพาราพันธุ์ต่างๆ ที่ทำการติดตาด้วยกิ่งพันธุ์ RRIM 600 (heterograft) และต้นยางพันธุ์ RRIM 600 ที่ทำการติดตาด้วยกิ่งพันธุ์ RRIM 600 (homograft) ทำการเปรียบเทียบกับต้นยางพาราพันธุ์ต่างๆ และพันธุ์ RRIM 600 ที่ไม่ได้ทำการติดตา



**รูปที่ 26** ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg/g) ในต้นตอยางพาราพันธุ์ต่างๆ ที่ทำการติดตาด้วยกิ่งพันธุ์ RRIT 251 (heterograft) และต้นยางพันธุ์ RRIT 251 ที่ทำการติดตาด้วยกิ่งพันธุ์ RRIT 251 (homograft) ทำการเปรียบเทียบกับต้นยางพาราพันธุ์ต่างๆ และพันธุ์ RRIT 251 ที่ไม่ได้ทำการติดตา

#### 4. การศึกษาการเจริญเติบโตของกิ่งพันธุ์ดีหลังการติดตาด้วยต้นตอยางพาราต่างๆ

การศึกษากการเจริญเติบโตของกิ่งพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 ที่ทำการติดตาบนต้นตอพันธุ์ต่างๆ พันธุ์ RRIM 623, ยางพาราพื้นเมืองพันธุ์บางรัก (B) และ ยางพาราพื้นเมืองพันธุ์ควนมดแดง (K) เมื่อทำการติดตาไปแล้ว 21 วัน ทำการตรวจดูการเจริญเติบโต โดยแผ่นตาที่ยังมีสีเขียวแสดงว่า การติดตาประสบผลสำเร็จ (รูปที่ 27A) แต่ถ้าแผ่นตาเปลี่ยนเป็นสีดำหรือสีน้ำตาล แสดงว่าการติดตาไม่ประสบผลสำเร็จ (รูปที่ 27B)



(A)



(B)

รูปที่ 27 ผลการตรวจสอบการเจริญเติบโตของแผ่นตาหลังการติดตา 21 วัน

(A) แผ่นตาที่ยังมีสีเขียว แสดงถึงการติดตาประสบผลสำเร็จ

(B) แผ่นตาเปลี่ยนเป็นสีดำหรือสีน้ำตาล แสดงถึงการติดตาไม่ประสบผลสำเร็จ

##### 4.1 ผลสำเร็จของการติดตา และจำนวนวันแตกยอดใหม่ของกิ่งพันธุ์ดีหลังการติดตาบนต้นตอยางพาราที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาผลสำเร็จของการติดตากิ่งพันธุ์ RRIM600 และ RRIT251 บนต้นตอยางพาราพันธุ์ RRIM 623 พันธุ์พื้นเมืองบางรัก (B) และพันธุ์พื้นเมืองควนมดแดง (K) พบว่าในช่วง 3 ถึง 7 วันแรกหลังจากทำการติดตา (รูปที่ 28A) บริเวณเนื้อเยื่อรอบๆ แผ่นตา และบริเวณ

บาดแผลของต้นตอจะเกิดเป็นสีน้ำตาล และมีส่วนของเนื้อเยื่อที่เกิดการตายเกิดขึ้น (รูปที่ 28B-D) หลังจากนั้นประมาณอีก 14 วัน ต้นยางพาราที่ติดตามจะมีการสร้างแคลลัสบริเวณเนื้อเยื่อที่เกิดการเชื่อมประสานกันระหว่างต้นตอพันธุ์พื้นเมืองกับกิ่งพันธุ์ดี และบริเวณเนื้อเยื่อของต้นตอพันธุ์พื้นเมืองที่เกิดบาดแผลปรากฏให้เห็นอย่างชัดเจน (รูปที่ 28E-H) ซึ่งหลังจากทำการติดตามผ่านไป แล้ว 21 วัน จะสามารถทำการตรวจสอบความสำเร็จของการติดตามได้ โดยดูการเจริญเติบโตของ แผ่นตาที่ยังมีสีเขียวอยู่แสดงว่าการติดตามของต้นยางพารานั้นประสบความสำเร็จ (รูปที่ 28I-L) และ จะเกิดรอยเชื่อมประสานกันของเนื้อเยื่อบริเวณแผ่นตาของกิ่งพันธุ์ดีกับเนื้อเยื่อของต้นตอพันธุ์ต่างๆ อย่างสมบูรณ์เมื่อทำการติดตามครบ 28 วัน (รูปที่ 28M-P) หลังจากทำการตัดยอดต้นตอ 15 วัน และทำการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จของการติดตาม จากการศึกษาในกิ่งตอพันธุ์ RRIM 600 ที่ทำการติดตามบนต้นตอพันธุ์ RRIM 623 และพื้นเมืองควนמדแดง (K) สามารถติดตามได้สำเร็จ 100 เปอร์เซ็นต์ ในกิ่งตอพันธุ์ RRIM 600 ที่ทำการติดตามบนต้นตอพันธุ์พื้นเมืองบางรัก (B) และการติดตามของกิ่งพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตอพันธุ์ RRIM 600 (homograft) มีเปอร์เซ็นต์การติดตามสำเร็จ 88.89 และ 71.43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับจำนวนวันที่แตกตาใหม่ของกิ่งตอพันธุ์ RRIM 600 หลังจากการตัดยอดต้นตอ พบว่า ในกิ่งพันธุ์ที่ติดตามบนต้นตอพันธุ์พื้นเมืองควนמדแดง (K) ใช้เวลาในการแตกยอดใหม่หลังจากทำการตัดยอดต้นตอน้อยที่สุดเพียง 10 วัน รองลงมาคือ กิ่งพันธุ์ที่ติดตามบนต้นตอพันธุ์ RRIM 600 และพันธุ์พื้นเมืองบางรัก (B) และพันธุ์ RRIM 623 (ตารางที่ 4)

สำหรับกิ่งตอพันธุ์ RRIT 251 พบว่า กิ่งตอพันธุ์ RRIT 251 ที่ติดตามบนต้นตอพันธุ์พื้นเมืองควนמדแดง (K) สามารถติดตามได้สำเร็จ 100 ตามด้วยกิ่งพันธุ์ที่ติดตามบนต้นตอพันธุ์ RRIM 623 พันธุ์พื้นเมืองบางรัก (B) และต้นตอพันธุ์ RRIT 251 (homograft) มีเปอร์เซ็นต์การติดตามสำเร็จ 88.89, 66.67 และ 88.89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จำนวนวันที่แตกตาใหม่ของกิ่งพันธุ์ RRIT 251 เมื่อทำการตัดยอดต้นตอทิ้ง พบว่า กิ่งพันธุ์ที่ติดตามบนต้นตอพันธุ์พื้นเมืองบางรัก (B) และพันธุ์พื้นเมืองควนמדแดง (K) ใช้เวลาในการแตกยอดใหม่น้อยที่สุด 11 วัน (ตารางที่ 5)



(A)



(B)



(C)



(D)



(G)



(H)



(I)



(J)

รูปที่ 28 ลักษณะการเจริญเติบโต และการพัฒนาของเนื้อเยื่อบริเวณรอยต่อระหว่างแผ่นตาของกิ่งพันธุ์ดีกับเนื้อเยื่อของต้นตอพันธุ์ต่างๆ หลังจากการติดตามไปแล้ว 1 วัน (A), 3 วัน (B), 7 วัน (C และ D), 14 วัน ที่ได้รับการติดตามกับกิ่งพันธุ์ RRIM 600 (E และ F) และพันธุ์ RRIT 251 (G และ H), 21 วัน ที่ได้รับการติดตามกับกิ่งพันธุ์ RRIM 600 (I และ J) และ พันธุ์ RRIT 251 (K และ L) และ 28 วัน ที่ได้รับการติดตามกับกิ่งพันธุ์ RRIM 600 (M และ N) และ พันธุ์ RRIT 251 (O และ P)



(K)



(L)



(M)



(N)



(O)



(P)

รูปที่ 28 (ต่อ) ลักษณะการเจริญเติบโต และการพัฒนาของเนื้อเยื่อบริเวณรอยต่อระหว่างแผ่นตาของกิ่งพันธุ์ดีกับเนื้อเยื่อของต้นตอพันธุ์ต่างๆ หลังจากการติดตามไปแล้ว 1 วัน (A), 3 วัน (B), 7 วัน (C และ D), 14 วัน ที่ได้รับการติดต่อกับกิ่งพันธุ์ RRIM 600 (E และ F) และพันธุ์ RRIT 251 (G และ H), 21 วัน ที่ได้รับการติดต่อกับกิ่งพันธุ์ RRIM 600 (I และ J) และพันธุ์ RRIT 251 (K และ L) และ 28 วัน ที่ได้รับการติดต่อกับกิ่งพันธุ์ RRIM 600 (M และ N) และพันธุ์ RRIT 251 (O และ P)

ตารางที่ 4 ผลสำเร็จของการติดตาม และจำนวนวันแตกยอดใหม่ของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตอพันธุ์ต่างๆ

กิ่งพันธุ์ดี/ ต้นตอ	เปอร์เซ็นต์การติดตามสำเร็จ (%)	จำนวนวันแตกยอดใหม่ (วัน)
<b>Homograft</b>		
RRIM600/ RRIM600	71.43	11
<b>Heterograft</b>		
RRIM600/ RRIM623	100	12
RRIM600/ B	88.89	11
RRIM600/ K	100	10
LSD	ns	ns
C.V. (%)	20.10	12.86

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD

ตารางที่ 5 ผลสำเร็จของการติดตาม และจำนวนวันแตกยอดใหม่ของยางพาราพันธุ์ RRIT 251 บนต้นตอพันธุ์ต่างๆ

กิ่งพันธุ์ดี/ ต้นตอ	เปอร์เซ็นต์การติดตามสำเร็จ (%)	จำนวนวันแตกยอดใหม่ (วัน)
<b>Homograft</b>		
RRIT251/ RRIT 251	88.89	15
<b>Heterograft</b>		
RRIT251/ RRIM 623	88.89	12
RRIT251/ B	66.67	11
RRIT251/ K	100	11
LSD	ns	ns
C.V. (%)	28.12	31.18

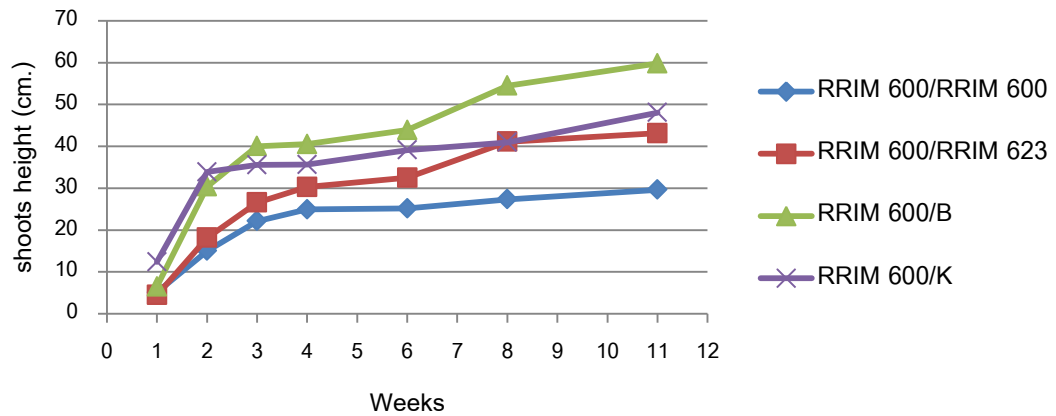
ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD

## 4.2 ผลการเจริญเติบโตของยอดที่แตกใหม่ในกิ่งต่าพันธุ์ดี บนต้นตอพันธุ์ต่างๆ ยางพาราที่แตกต่างกัน

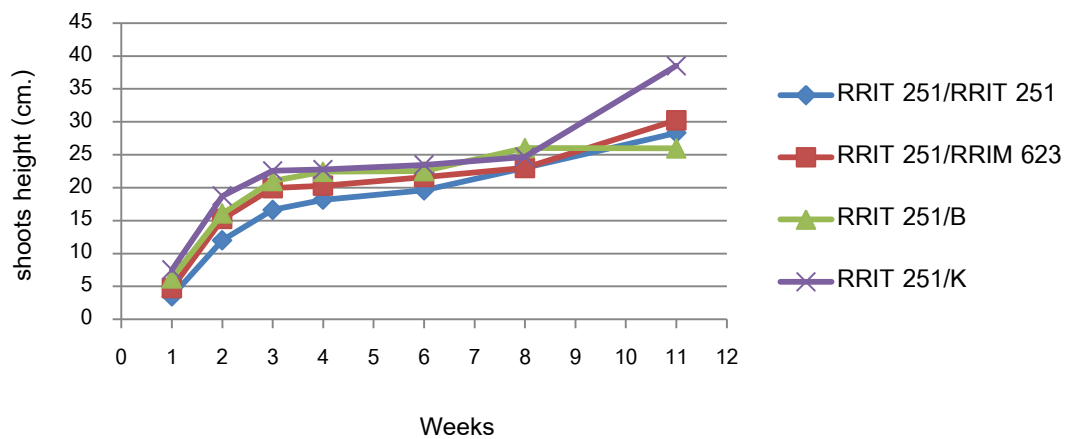
### 4.2.1 ความสูงของยอดที่แตกใหม่

ความสูงของยอดที่แตกใหม่ในกิ่งพันธุ์ RRIM 600 ที่ติดตามต้นตอพันธุ์ RRIM 600 (homograft) และที่ทำการติดตามต้นตออย่างพาราพันธุ์ RRIM 623 พันธุ์พื้นเมืองบางรัก (B) และพันธุ์พื้นเมืองควนמדแดง (K) พบว่าในช่วง 1-3 สัปดาห์แรกหลังจากที่ต้นยางพารามีการแตกยอดใหม่ ต้นยางมีความสูงของยอดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังจากสัปดาห์ที่ 3 มีอัตราความสูงของต้นยางเริ่มช้าลง และคงที่ เนื่องจากยอดที่แตกใหม่เริ่มสร้างใบเพื่อใช้ในการสังเคราะห์แสง และหลังจากที่ต้นยางมีการแตกยอดใหม่ผ่านไป 6 สัปดาห์ พบว่ากิ่งพันธุ์ RRIM 600 ที่ติดตามต้นตออย่างพาราพันธุ์พื้นเมืองบางรัก (B) มีความสูงของยอดที่แตกใหม่สูงที่สุดเฉลี่ย 41.74 เซนติเมตร (รูปที่ 29) รองลงมาคือ กิ่งต่าที่ทำการติดตามต้นตออย่างพาราพันธุ์พื้นเมืองควนמדแดง (K) และพันธุ์ RRIM 623 เฉลี่ย 36.14 และ 30.50 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนกิ่งต่าที่ติดตามต้นตอพันธุ์ RRIM 600 มีความสูงของยอดที่แตกใหม่น้อยที่สุด เฉลี่ย 24.26 เซนติเมตร

สำหรับความสูงของยอดที่แตกใหม่ในกิ่งพันธุ์ RRIT 251 ที่ติดตามต้นตอพันธุ์ต่างๆ พบว่าในช่วง 1-3 สัปดาห์แรกหลังจากที่ต้นยางพารามีการแตกยอดใหม่ ต้นยางมีความสูงของยอดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นความสูงของยอดที่แตกใหม่มีการเพิ่มของความสูงที่คงที่ และมีความสูงของยอดไม่แตกต่างกันบนต้นตอแต่ละพันธุ์ (รูปที่ 30) โดยในช่วงหลังจากสัปดาห์ที่ 8 กิ่งพันธุ์ RRIT 251 ที่ติดตามต้นตอพันธุ์พื้นเมืองควนמדแดง (K) ให้ความสูงเฉลี่ยของยอดที่แตกใหม่สูงที่สุดเท่ากับ 23.51 เซนติเมตร รองลงมาคือ กิ่งต่าที่ติดตามต้นตอพันธุ์พื้นเมืองบางรัก (B) พันธุ์ RRIM 623 และต้นตอพันธุ์ RRIT 251 โดยมีความสูงของยอดที่แตกใหม่เฉลี่ยเท่ากับ 22.68, 20.51 และ 18.13 เซนติเมตร ตามลำดับ หลังจากสัปดาห์ที่ 8 ต้นยางเริ่มมีความสูงของยอดที่แตกใหม่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วทั้งในกิ่งพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 ที่ทำการติดตามต้นตอบางพันธุ์ เนื่องจากกิ่งพันธุ์เริ่มมีการสร้างฉัตรที่ 2



รูปที่ 29 ความสูงของยอดหลังจากการแตกตาใหม่ของกิ่งพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตอพันธุ์ RRIM 600 (homograft) และต้นตออย่างพาราพันธุ์ต่างๆ



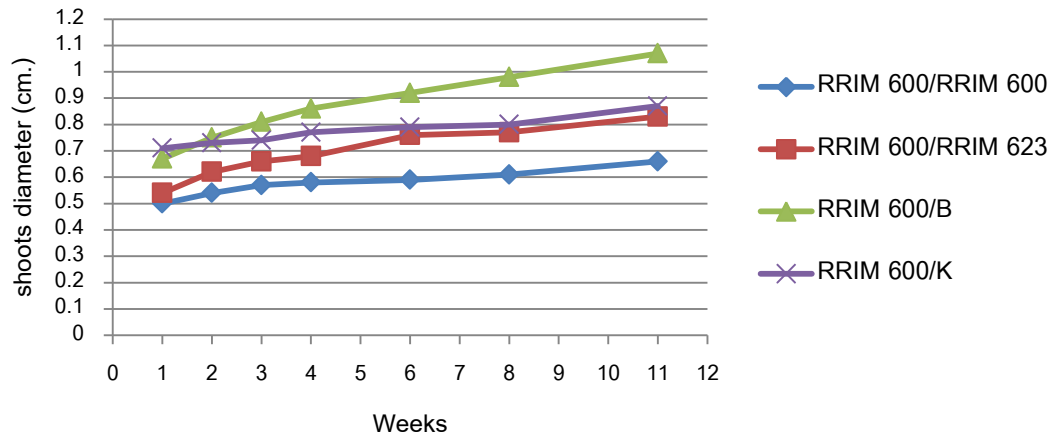
รูปที่ 30 ความสูงของยอดหลังจากการแตกตาใหม่ของกิ่งพันธุ์ RRIT 251 บนต้นตอพันธุ์ RRIT 251 (homograft) และต้นตออย่างพาราพันธุ์ต่างๆ



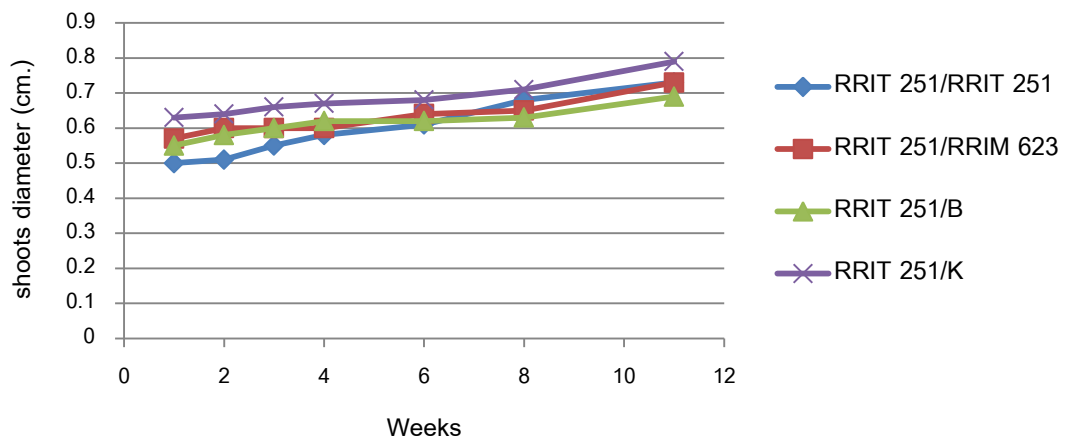
#### 4.2.2 เส้นผ่านศูนย์กลางของยอดที่แตกใหม่

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของยอดใหม่กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ที่ติดตามต้นตอพันธุ์ RRIM 600 (homograft) พันธุ์ RRIM 623, ยางพาราพันธุ์พื้นเมืองบางรัก (B) และยางพาราพันธุ์พื้นเมืองควนמדแดง (K) พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของยอดใหม่ที่ติดตามต้นตอของพันธุ์ต่างๆ มีการเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ (รูปที่ 31) โดยกิ่งพันธุ์ RRIM 600 ที่ติดตามต้นตอพันธุ์พื้นเมืองบางรัก (B) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของยอดใหม่เฉลี่ยสูงที่สุด เท่ากับ 0.87 เซนติเมตร รองลงมาคือ กิ่งตอพันธุ์ RRIM 600 ที่ติดตามต้นตอพันธุ์พื้นเมืองควนמדแดง (K), พันธุ์ RRIM 623 และพันธุ์ RRIM 600 โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของยอดใหม่เฉลี่ย เท่ากับ 0.77, 0.72 และ 0.60 เซนติเมตร ตามลำดับ

สำหรับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของยอดใหม่ในกิ่งพันธุ์ RRIT 251 ที่ติดตามต้นตอพันธุ์ RRIT 251 (homograft) พันธุ์ RRIM 623 พันธุ์พื้นเมืองบางรัก (B) และพันธุ์พื้นเมืองควนמדแดง (K) พบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของยอดใหม่มีขนาดเพิ่มขึ้นคงที่ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 แต่หลังจากสัปดาห์ที่ 8 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของยอดใหม่ในกิ่งพันธุ์ RRIT 251 ที่ติดตามต้นตอของแต่ละพันธุ์เริ่มเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 32) โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของยอดใหม่ที่ติดตามต้นตอพันธุ์พื้นเมืองควนמדแดง (K) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางสูงที่สุด เฉลี่ย 0.69 เซนติเมตร รองลงมาคือขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของยอดใหม่ที่ติดตามต้นตอพันธุ์ RRIM 623, พันธุ์พื้นเมืองบางรัก (B) และพันธุ์ RRIT 251 มีค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของยอดใหม่เท่ากับ 0.64, 0.62 และ 0.59 เซนติเมตร ตามลำดับ



รูปที่ 31 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของยอดหลังจากการแตกตาใหม่ของกิ่งพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตอพันธุ์ RRIM 600 (homograft) และต้นตออย่างพาราพันธุ์ต่างๆ

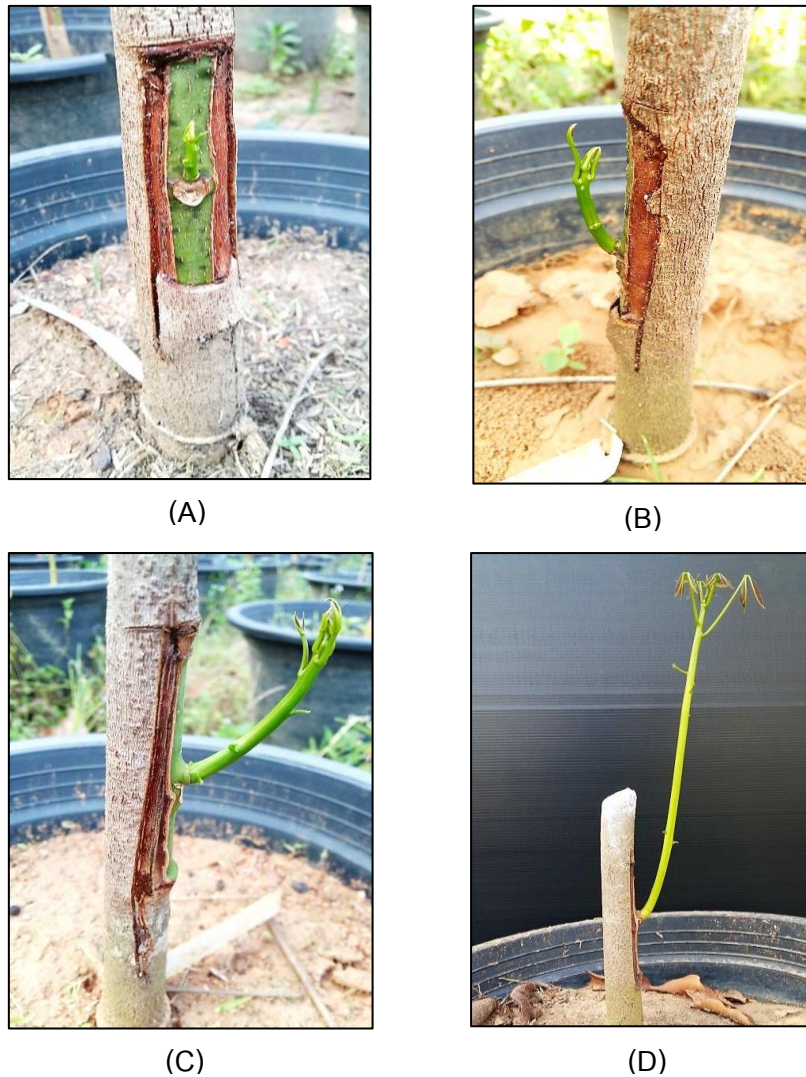


รูปที่ 32 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของยอดหลังจากการแตกตาใหม่ของกิ่งพันธุ์ RRIT 251 บนต้นตอพันธุ์ RRIT 251 (homograft) และต้นตออย่างพาราพันธุ์ต่างๆ

### 4.2.3 จำนวนใบ

กิ่งพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 ที่ติดตามบนต้นตอย่างพาราพันธุ์ต่างๆ คือ พันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 (homograft) ต้นตอพันธุ์ RRIM 623 พันธุ์พื้นเมืองบางรัก (B) และ พันธุ์พื้นเมืองควนมดแดง (K) (heterograft) หลังจากทำการตัดยอดต้นตอประมาณ 1 สัปดาห์ ยอดที่แตกใหม่จะเริ่มสร้างใบ (รูปที่ 33A-D) จากการเก็บข้อมูลจำนวนใบเพศลาต (รูปที่ 33E-F) โดยเก็บข้อมูลหลังจากที่กิ่งตามีการแตกยอดใหม่ไปแล้ว 5 สัปดาห์ และจะมีการสร้างใบได้ ประมาณ 1 ฉัตร (รูปที่ 33G) พบว่าจำนวนใบของทั้งกิ่งพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 ที่ติดตามบนต้นตอย่างพาราแต่ละพันธุ์เริ่มมีจำนวนใบที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังจากสัปดาห์ที่ 6 ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากต้นยางเริ่มมีการสร้างใบของฉัตรที่ 2 (รูปที่ 33H) กิ่งต่าที่ทำการติดตามบนต้นตอพันธุ์พื้นเมืองบางรัก (B) มีจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 45 ใบ รองลงมาคือ กิ่งพันธุ์ที่ติดตามบนต้นตอพันธุ์พื้นเมืองควนมดแดง (K) พันธุ์ RRIM 623 และพันธุ์ RRIM 600 โดยมีจำนวนใบเฉลี่ย 41, 33 และ 27 ใบ ตามลำดับ (รูปที่ 34)

สำหรับจำนวนใบของยอดที่แตกใหม่ของกิ่งพันธุ์ RRIT 251 ที่ติดตามบนต้นตอพันธุ์ต่างๆ พบว่า กิ่งต่าที่ทำการติดตามบนต้นตอย่างพันธุ์ RRIT 251 และต้นตอย่างพันธุ์พื้นเมือง มีจำนวนใบที่ไม่แตกต่างกัน โดยกิ่งพันธุ์ที่ติดตามบนต้นตอพันธุ์ RRIT 251 พันธุ์ RRIM 623 พันธุ์พื้นเมืองบางรัก (B) และพันธุ์พื้นเมืองควนมดแดง (K) มีจำนวนใบเฉลี่ย เท่ากับ 34, 32, 31 และ 32 ใบ ตามลำดับ (รูปที่ 35)



**รูปที่ 33** การเจริญเติบโต และการพัฒนาของตาทิ้งพันธุ์ RRIM600 และ RRIT251 หลังจากทำการตัดยอดต้นตอพันธุ์ต่างๆ

(A) ถึง (D) การเจริญเติบโต และการพัฒนาสำหรับการสร้างใบเพื่อการสังเคราะห์แสงของยอดที่แตกใหม่

(E) ถึง (F) ใบเพศลาดในยอดที่แตกใหม่ของกิ่งตาทิ้งพันธุ์ดี

(G) การเจริญเติบโต และการพัฒนาของยอดแตกใหม่ที่มีการสร้างใบจำนวน 1 คู่

(H) การเจริญเติบโต และการพัฒนาของยอดแตกใหม่ที่มีการสร้างใบจำนวน 2 คู่



(E)



(F)



(G)



(H)

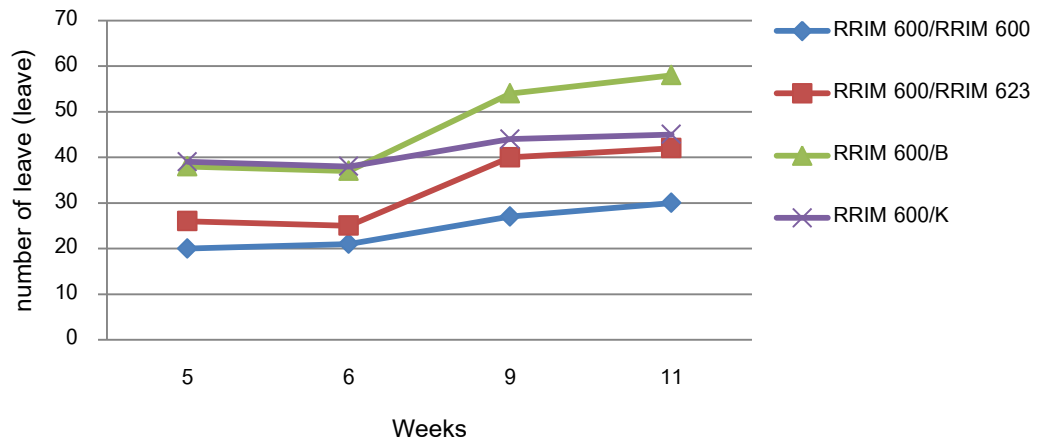
**รูปที่ 33 (ต่อ)** การเจริญเติบโต และการพัฒนาของตาทิ้งพันธุ์ RRIM600 และ RRIT251 หลังจากทำการตัดยอดต้นตอพันธุ์ต่างๆ

(A) ถึง (D) การเจริญเติบโต และการพัฒนาสำหรับการสร้างใบเพื่อการสังเคราะห์แสงของยอดที่แตกใหม่

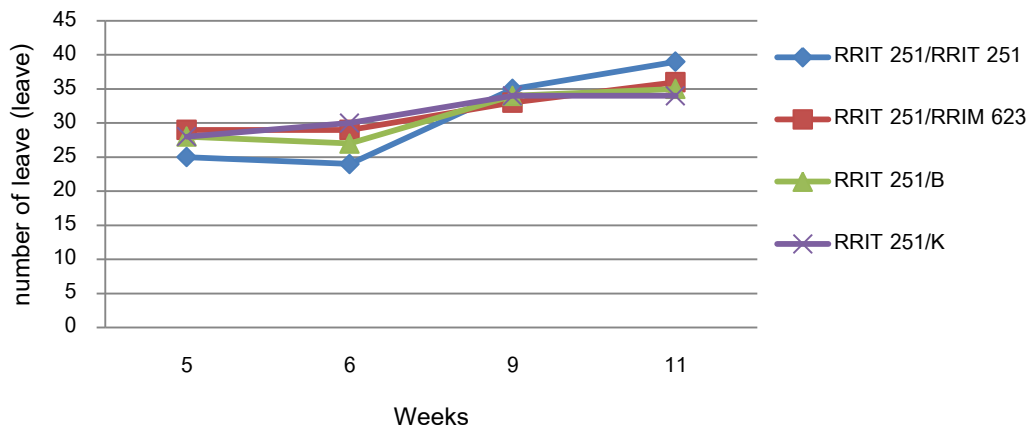
(E) ถึง (F) ใบเพศลาดในยอดที่แตกใหม่ของกิ่งตาทิ้งพันธุ์ดี

(G) การเจริญเติบโต และการพัฒนาของยอดแตกใหม่ที่มีการสร้างใบจำนวน 1 ชั้น

(H) การเจริญเติบโต และการพัฒนาของยอดแตกใหม่ที่มีการสร้างใบจำนวน 2 ชั้น



รูปที่ 34 จำนวนใบหลังจากการแตกตาใหม่ของกิ่งพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตอพันธุ์ RRIM 600 (homograft) และต้นตออย่างพาราพันธุ์ต่างๆ



รูปที่ 35 จำนวนใบหลังจากการแตกตาใหม่ของกิ่งพันธุ์ RRIT 251 บนต้นตอพันธุ์ RRIT 251 (homograft) และต้นตออย่างพาราพันธุ์ต่างๆ

## บทที่ 4

### วิจารณ์

ในการปลูกสร้างสวนยางจำเป็นจะต้องใช้ต้นตอตายางพาราซึ่งได้จากการนำเมล็ดยางมาเพาะ และติดตาโดยใช้กิ่งตาจากต้นพันธุ์ดี ทำให้ได้ต้นที่ตรงตามพันธุ์ ในอดีตต้นตอส่วนใหญ่ได้มาจากยางพาราพันธุ์พื้นเมืองหรือพันธุ์ที่มีการนำเข้ามาในระยะแรกของการปลูกยาง ซึ่งเป็นพันธุ์ผสมเปิด มีฐานพันธุกรรมกว้าง ระบบรากมีความแข็งแรง สามารถทนทานต่อโรครากได้ดี จึงเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นต้นตอในการปลูกยางพารา แต่ในปัจจุบันต้นตอส่วนใหญ่ได้มาจากเมล็ดของต้นยางพันธุ์ RRIM 600 เพราะมีพื้นที่การปลูกมากที่สุดซึ่งส่วนใหญ่ระบบรากของยางพันธุ์นี้จะมีความแข็งแรงน้อยกว่าพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งเสี่ยงต่อการระบาดของโรคราก เช่น โรครากขาว ยางพันธุ์ RRIM 600 มีความอ่อนแอต่อโรครากขาวมาก (อุไร และคณะ, 2538) ดังนั้น การใช้ต้นตอ ยางพาราพันธุ์พื้นเมือง หรือต้นตอที่มีระบบรากแข็งแรง และทนทานต่อโรครากได้ดีจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการลดปัญหาการเกิดโรค อย่างไรก็ตามการคัดเลือกต้นตอ ยางพาราที่มีการเจริญเติบโตที่ดี และมีศักยภาพในการต้านทานโรครากแล้ว ยังพบว่ายางพาราที่ใช้ในการผลิตต้นตอแต่ละพันธุ์มีความสามารถในการเข้ากันได้กับกิ่งพันธุ์ดีแตกต่างกัน รัชนิกร และ จรัสศรี (2555) ได้ศึกษาอิทธิพลของต้นตอ ยางพาราพันธุ์พื้นเมืองจาก 5 แหล่งที่มาในภาคใต้ ต่อการเจริญเติบโตของกิ่งตา RRIM 600 พบว่าต้นตอจากการเพาะเมล็ดที่เก็บมาจากที่ต่างๆ ส่งผลต่อการเจริญเติบโตทางด้าน ความสูง เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น และจำนวนใบของกิ่งพันธุ์ RRIM 600 ได้แตกต่างกัน สอดคล้องกับ Sobhana และคณะ (2001) ที่ศึกษาผลของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ของยางพาราต่อลักษณะทาง สรีรวิทยา และชีวเคมีของยางพารา 5 พันธุ์ พบว่าความแตกต่างของ CO<sub>2</sub> assimilation rate เป็นอิทธิพลที่เกิดจากต้นตอ และพบว่า ปริมาณน้ำตาล (total soluble sugars และ reducing sugars), สารประกอบฟีนอล และปริมาณกรดอะมิโน ที่แตกต่างกันเกิดจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ นอกจากนี้ Goncalves และ Martins (2002) รายงานว่า ผลผลิตของยางพารามีความแตกต่างกัน ประมาณ 18-20 เปอร์เซ็นต์ จากการใช้ต้นตอพันธุ์ต่างๆ แสดงให้เห็นว่า ต้นตอมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโต และผลผลิตน้ำยาง อีกทั้งต้นตอสามารถเข้ากันได้ดีกับกิ่งตาพันธุ์ดี ทำให้การเจริญเติบโตทางด้านลำต้นในระยะแรกรวดเร็ว ส่งผลให้ยางพาราสามารถเจริญเติบโตได้เร็ว และเปิดกรีดได้เร็วขึ้น ซึ่งผลดังกล่าวอาจเกิดจากระดับความสามารถในการเข้ากันได้ของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีที่แตกต่างกัน Darikova และคณะ (2011) กล่าวว่า ปัญหาของความเข้ากันไม่ได้ของเนื้อเยื่อระหว่างต้นตอ และกิ่งตา อาจมีผลทำให้เกิดลักษณะอาการตายจากยอด (dieback) ของ

ต้นพืชหลังจากปลูก โดยพบว่าเมื่อมีการติดตาหรือทาบกิ่ง พืชจะมีการกระตุ้นให้ผลิตสารประกอบฟีนอลิก เนื่องจากการเกิดบาดแผล โดยพืชจะมีการหลั่งสารประกอบจำพวกฟีนอล หากพบปริมาณฟีนอลในบริเวณรอยเชื่อมที่มีการทาบกิ่งหรือติดตา มาก จะส่งผลให้เกิดความไม่เข้ากันของเนื้อเยื่อได้ (Errea, 1998) จึงมีการใช้ปริมาณฟีนอล บริเวณส่วนบน และส่วนล่างของรอยต่อที่เกิดจากการทาบกิ่งหรือติดตา เป็นตัวตรวจสอบความเข้ากันได้ของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีในไม้ผลหลายชนิด เช่น แอปริคอต (Usenik, et al., 2006) และ *U. kirkiana* (Mngomba, et al., 2008) สารประกอบฟีนอลจะถูกสังเคราะห์โดยเอนไซม์ *Phenylalanine ammonia lyase (PAL)* Pina และ Errea (2008) รายงานว่าหากมีการแสดงออกของเอนไซม์ *PAL* ต่ำจะทำให้เนื้อเยื่อสามารถเจริญเข้ากันได้ นอกจากนี้ Dos Santos Pereira และคณะ (2014) ศึกษาการทาบกิ่งในพืชที่มีการทาบกิ่งด้วยต้นตอพืชชนิดต่างๆ และต้นตอที่เป็นแอปริคอต เมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของเอนไซม์ *PAL* ในส่วนด้านบน และด้านล่างของบริเวณที่ทำการทาบกิ่ง พบว่ามีการแสดงออกของเอนไซม์ *PAL* ในปริมาณที่สูงในต้นตอแอปริคอต เมื่อเปรียบเทียบกับต้นตอที่เป็นพืชเองซึ่งมีพันธุกรรมที่เหมือนกัน เนื่องจากเกิดการสะสมสารประกอบฟีนอลิก และทำให้เกิดความไม่เข้ากันของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี ดังนั้นการศึกษากการแสดงออกของเอนไซม์ *PAL* หลังทำการติดตาที่ระยะเวลาต่างๆ จึงอาจช่วยในการตรวจสอบความเข้ากันได้ของต้นตออย่างพาราพันธุ์ต่างๆ และกิ่งพันธุ์ดี หากพบว่าการแสดงออกของเอนไซม์ดังกล่าวสอดคล้องกับความเข้ากันได้ของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี อาจนำมาประยุกต์ใช้ในการทำนายเบื้องต้นถึงระดับความเข้ากันได้ เพื่อคัดเลือกต้นตอที่สามารถเข้ากันได้กับกิ่งพันธุ์ดี

ในการศึกษาถึงความสามารถในการเข้ากันได้ของต้นตออย่างพาราพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ พันธุ์ RRIM 623 พันธุ์พื้นเมืองบางรัก (B) และ พันธุ์พื้นเมืองควนמדแดง (K) ทำการติดตาอย่างพาราโดยใช้ตาของกิ่งพันธุ์ดี พันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ RRIT251 ซึ่งเป็นพันธุ์แนะนำของศูนย์วิจัยยางสำหรับเกษตรกรที่ทำการปลูกสร้างสวนยางในปัจจุบัน โดยได้รับความอนุเคราะห์ยางพารากิ่งพันธุ์ดีและผู้ชำนาญการด้านการติดต้ายางพาราจากศูนย์วิจัยยางสงขลา ทำการตรวจสอบการแสดงออกของเอนไซม์ *Phenylalanine ammonia lyase (PAL)* ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก (total phenolic content; TPC) รวมถึงการศึกษากการเจริญเติบโต และการพัฒนาของต้นยาง หลังจากได้รับการติดตาเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออกของเอนไซม์ *PAL* และปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกบริเวณส่วนของเนื้อเยื่อที่ทำการติดตา สำหรับการทำนายเบื้องต้นถึงระดับความเข้ากันได้ และคัดเลือกต้นตอที่สามารถเข้ากันได้กับกิ่งพันธุ์ดี โดยในขั้นแรกนั้นจำเป็นต้องทำการโคลนเอนไซม์ *PAL* เนื่องจากยังไม่มีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ดังกล่าวในยางพารา สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของเอนไซม์ *PAL* ในยางพารา เริ่มด้วยการออกแบบ degenerated primer จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืช



ชนิดอื่นในฐานข้อมูล GenBank ในการโคลนยีน และศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณส่วนกลางของยีน *PAL* พบว่าชิ้นส่วนของยีนที่โคลนได้มีขนาด 1,352 นิวคลีโอไทด์ เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงความเหมือนกับยีน *PAL* ในพืชอื่นจึงทำการศึกษาขั้นต่อไป คือ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์เส้นสมบูรณ์ของยีน *PAL* โดยการออกแบบ specific primer จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบแล้วนี้ เพื่อใช้สำหรับหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณส่วนที่เหลือ คือ ปลาย 5' และปลาย 3' ของยีน *PAL* ด้วยเทคนิค 5'-3' RACE จากการศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของปลาย 3' พบว่ามีขนาด 970 นิวคลีโอไทด์ และพบรหัสหยุด คือ TAA ในบริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 3' ที่ทำการโคลนได้ ส่วนยีน *PAL* ด้านปลาย 5' ไม่สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค 5' RACE ได้สำเร็จ จึงทำการออกแบบ degenerated primer ด้านปลาย 5' โดยการทำ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAL* กับสมู้ดำ และมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในตระกูลเดียวกันกับยางพาราจากฐานข้อมูล GenBank และทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณของยีนได้ชิ้นส่วนขนาด 444 นิวคลีโอไทด์ เมื่อได้ชิ้นส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดแล้วจึงนำมาต่อกันโดยใช้โปรแกรมของ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด และการวิเคราะห์คุณลักษณะของยีน *PAL* ในยางพารา พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAL* เส้นสมบูรณ์ มีขนาด (open reading frame) 2,145 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นโปรตีนได้ขนาด 721 กรดอะมิโน เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAL* ที่ได้กับฐานข้อมูลของ GenBank ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกับยีน *PAL* ของมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) 93 เปอร์เซ็นต์ สมู้ดำ (*Jatropha curcas*) 86 เปอร์เซ็นต์ โกงกางใบใหญ่ (*Rhizophora mangle*) 83 เปอร์เซ็นต์ ลิ้นจี่ (*Litchi chinensis*) 81 เปอร์เซ็นต์ โรบิเนียดอกขาว (*Robinia pseudoacacia*) 80 เปอร์เซ็นต์ มังคุด (*Garcinia mangostana*) 80 เปอร์เซ็นต์ ถั่วเหลือง (*Glycine soja*) 81 เปอร์เซ็นต์ ท้อ (*Prunus persica*) 80 เปอร์เซ็นต์ เชอร์รี่ป่า (*Prunus avium*) 80 เปอร์เซ็นต์ ส้มคลีเมนไทน์ (*Citrus clementina*) 80 เปอร์เซ็นต์ และองุ่น (*Vitis vinifera*) 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *HbPAL* พบว่ามีตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved domain) ซึ่งเป็นลักษณะที่สำคัญของยีนได้แก่ บริเวณของ phenylalanine/histidine ammonia-lyase รูปแบบของกรดอะมิโนที่พบในยางพารา คือ GTITASGDLVPLSYIA ในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 196-211 และยังมีกรดอะมิโน Ala-Ser-Gly ในตำแหน่งที่ 200-202 เป็นบริเวณของ MIO (3,5-dihydro-5-methylidene-4H-imidazol-4-one) ซึ่งเป็น coenzyme ที่ยึดเหนี่ยวกับโปรตีนด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) โดยเป็นส่วนที่ไม่ใช่โปรตีนทำหน้าที่ร่วมกับ apoenzyme ในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (MacDonald และ D' Cunha, 2007) ซึ่งกรดอะมิโน

ทั้งสองบริเวณนี้มีบทบาทสำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ phenylalanine/ histidine ammonia-lyase เช่นเดียวกับในพืชอื่นๆ เช่น กล้ายไม้สกุลหวาย (*Dendrobium candidum*) ต้นยูคาลิปตัส (*Eucalyptus robusta*) และลิเวอร์เวิร์ด (*Plagiochasma appendiculatum*) (Jin *et al.*, 2013; Akimoto *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2014) อีกทั้งยังพบลำดับกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ในลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HbPAL ที่ตำแหน่งอื่นๆ ได้แก่ ตำแหน่ง Y-106, L-134, S-201, N-258, Q-346, Y-349, R-352, F-398 และตำแหน่ง Q-486 นอกจากนี้ยังพบ deamination site ในตำแหน่งของกรดอะมิโน L204, V205, L254 และ A255 และมีตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (catalytic active sites) ได้แก่ กรดอะมิโนในตำแหน่ง N258, G259, NDN (380-382), H394 และตำแหน่ง HNQDV (482-488) และลำดับกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ ATP (phosphorylation site) ในตำแหน่งของกรดอะมิโน VAKRVLT (541-548) ของโปรตีน PAL ในยางพาราเช่นเดียวกันกับในโปรตีน PAL ของ *Phaseolus vulgaris* (Allwood *et al.*, 1999) โดยทุกบริเวณตำแหน่งอนุรักษ์ของกรดอะมิโนดังกล่าวข้างต้นมีบทบาทหน้าที่ และตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เหมือนกันกับโปรตีน PAL ในสบู่ดำ (*Jatropha curcas*) (Gao *et al.*, 2012) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของโปรตีน PAL ในยางพารานั้นมีความถูกต้อง และจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับโปรตีน PAL จากหลายๆ การศึกษาของโปรตีน PAL โดยมีบริเวณอนุรักษ์ของลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกันกับพืชหลายๆ ชนิดสูงมาก ซึ่งลำดับของกรดอะมิโน PAL ในยางพารามีความเหมือนกับโปรตีน PAL ในพืชอื่นๆ มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *PAL* จำเป็นต้องมีการสกัดอาร์เอ็นเอจากชิ้นส่วนพืชของยางพารา คือ ส่วนของเปลือกยางพาราเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ cDNA สำหรับการการศึกษาการแสดงออกของยีน *PAL* หลังจากที่ได้ต้นยางที่ได้รับการติดตามแล้ว Venkatachalam และคณะ (1999) รายงานว่า การสกัดอาร์เอ็นเอจากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชที่มีโพลีฟีนอล (polyphenol) สูง เช่น ส่วนเปลือกของยางพารา ทำให้ยากต่อการสกัดอาร์เอ็นเอให้มีคุณภาพและความบริสุทธิ์สูง เพราะอาร์เอ็นเอจะเสถียรภาพได้ง่าย (degradation) จากสารทุติยภูมิที่พืชผลิตขึ้นมา ได้แก่ สารฟีนอลิก เทอร์ปีนอยด์ และแทนนิน ที่อาจจะจับอยู่กับอาร์เอ็นเอหลังจากการทำให้เซลล์ของพืชแตกในขั้นตอนของการสกัดอาร์เอ็นเอ ในการศึกษาทดลองจึงได้ทำการสกัดอาร์เอ็นเอจากส่วนเปลือกของยางพาราตามวิธีการของ Venkatachalam และคณะ (1999) พบว่า อาร์เอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอสูง และสามารถทำการสังเคราะห์ cDNA เพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *PAL* ได้สำเร็จ

ในการตรวจสอบความสำเร็จของการติดตามโดยการแสดงออกของยีน *HbPAL* ในระยะตอนต้นของกิ่งตาพันธุ์ดีพันธุ์ RRIM 600 และพันธุ์ RRIT 251 ที่ทำการติดตามบนต้นตอของ

ยางพาราพันธุ์ต่างๆ โดยศึกษาการแสดงออกของยีนในตัวอย่างต้นยางพาราที่ไม่ได้รับการติดตาม (control) การติดตามระหว่างกิ่งตัพันธ์ุดีกับต้นตอพันธ์ุเดียวกัน (homograft) ได้แก่ RRIM 600/ RRIM 600 และ RRIT 251/ RRIT 251 และการติดตามระหว่างกิ่งตัพันธ์ุดีกับต้นตอที่มีพันธ์ุแตกต่างกัน (heterograft) ได้แก่ RRIM 600/ RRIM 623, RRIM 600/ B, RRIM 600/ K, RRIT 251/ RRIM 623, RRIT 251/ B และ RRIT 251/ K หลังจากการติดตามที่ 7, 14, 21 และ 28 วัน พบว่า จากผลของการติดตามทั้งในกิ่งตัพันธ์ุ RRIM 600 และกิ่งตัพันธ์ุ RRIT 251 ที่ทำการติดตามบนต้นตอยางพาราพันธ์ุต่างๆ มีการแสดงออกของยีน *HbPAL* สูงที่สุดที่ 7 วันหลังจากทำการติดตาม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเกิดบาดแผลในบริเวณที่ติดตาม ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของยีน *HbPAL* หลังจากนั้นการแสดงออกของยีน *HbPAL* ลดลงอย่างเห็นได้ชัดที่ 14 วันหลังการติดตาม โดยกิ่งพันธ์ุ RRIM 600 มีระดับการแสดงออกของยีน *HbPAL* ลดลงมากกว่ากิ่งพันธ์ุ RRIT 251 ซึ่งการที่ระดับการแสดงออกของยีน *HbPAL* ลดลงเช่นนี้แสดงให้เห็นว่า ชิ้นส่วนของต้นตอ และกิ่งพันธ์ุดีสามารถเชื่อมประสานกันได้ดี โดยหลังการทำการติดตามไปแล้วประมาณ 10 วัน ต้นตอ และกิ่งพันธ์ุดีมีการสร้างแคลลัสขึ้นเพื่อซ่อมแซมบาดแผลบริเวณเนื้อเยื่อของต้นตอ และกิ่งพันธ์ุดี เพื่อสร้างระบบท่อน้ำ และท่ออาหารขึ้นมาใหม่ จากการเริ่มเชื่อมประสานกันของเนื้อเยื่อบริเวณที่ติดตามจึงทำให้การแสดงออกของยีน *HbPAL* เริ่มลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ ณฤทธิ (2559) ที่ทำการศึกษการเข้ากันได้ของต้นตอยางพาราที่ทนทานต่อโรครากขาวกับกิ่งพันธ์ุ RRIM 600 โดยพบว่า หลังจากทำการติดตามไปแล้ว 10 วัน เนื้อเยื่อแคลลัสของต้นตอ และกิ่งพันธ์ุดีเพิ่มปริมาณมากขึ้นอย่างรวดเร็วเจริญแทรกเข้าไปในช่องว่างของบาดแผลเกิดเป็นสะพานแคลลัสทำหน้าที่เชื่อมทั้งสองส่วนเข้าด้วยกันอย่างเห็นได้ชัดเจน และหลังจากทำการติดตามไปแล้ว 20 วัน แคลลัสที่สร้างขึ้นระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธ์ุดีเริ่มมีการพัฒนาไปเป็นแคมเบียมเพื่อสร้างท่อน้ำ และท่ออาหารใหม่ และจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *HbPAL* ในยางพาราแต่ละพันธ์ุ พบว่า กิ่งพันธ์ุ RRIM 600 ที่ติดตามบนต้นตอพันธ์ุ RRIM 623 (RRIM 600/ RRIM 623) มีการแสดงออกของยีน *HbPAL* สูงที่สุด มีระดับการแสดงออกของยีนมากกว่า 19 เท่า สำหรับในกิ่งพันธ์ุ RRIT 251 จากการศึกษพบว่ากิ่งตัพันธ์ุที่ติดตามบนต้นตอพันธ์ุพื้นเมืองบางรัก (RRIT 251/ B) มีระดับการแสดงออกของยีน *HbPAL* สูงที่สุด โดยมีค่าการแสดงออกของยีนมากกว่า 2.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับต้นยางที่ไม่ได้รับการติดตาม (control) จากการศึกษาของ Pina และ Errea (2008) ทำการศึกษการเชื่อมประสานกันของแคลลัสในพืชตระกูล *Prunus* ภายในหลอดทดลอง พบความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน *PAL* ภายหลังจากเกิดการเชื่อมประสานกันของแคลลัส 14 วัน โดยแคลลัสที่เกิดความล้มเหลวในการเชื่อมประสานกัน และแคลลัสหลุดแยกออกจากกันมีระดับการแสดงออกของยีน *PAL* สูงกว่าแคลลัสที่

สามารถเชื่อมประสานกันได้ดี และสอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆ ที่ศึกษาในพืชตระกูล Prunus และพบว่า การเข้ากันไม่ได้ของเนื้อเยื่อระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีมีการแสดงออกของยีน PAL สูง นอกจากนี้ยังพบว่า ยีน PAL1 มีการแสดงออกของยีนที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแสดงออกของยีน PAL2 โดยยีน PAL1 หลังจากมีการทาบกิ่งไปแล้ว 10 และ 21 วัน ในต้นที่เนื้อเยื่อประสานกันได้ดีไม่มีการแสดงออกของยีน PAL สูงที่สุดเมื่อเทียบกับช่วงวันอื่นๆ ส่วนในยีน PAL2 มีการแสดงออกของยีน PAL ที่สูงในต้นที่เนื้อเยื่อประสานกันได้ดีไม่หลังจากการทาบกิ่งไปแล้ว 21 วัน เพียงเท่านั้น (Dos Santos Pereira *et al.*, 2014, Irisarri *et al.*, 2016)

สำหรับปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) ในยางพาราที่ติดตาด้วยกิ่งพันธุ์ RRIM 600 และพันธุ์ RRIT 251 บนต้นตออย่างพาราพันธุ์ต่างๆ ไม่พบความแตกต่างของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดทั้งในการติดตาระหว่างพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 บนต้นตอพันธุ์ต่างๆ จากผลการทดลองค่า TPC ของต้นยางที่ไม่ได้รับการติดตานั้นมีค่า TPC ที่สูงและมีค่าไม่แตกต่างกับค่า TPC ของต้นยางที่ได้รับการติดตาทั้งในกิ่งพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 เนื่องจากยางพาราเองนั้นเป็นพืชที่มียางเป็นองค์ประกอบเดิมอยู่แล้ว หรือมีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่สูงตามธรรมชาติ (Venkatachalam *et al.*, 1999) โดยไม่ต้องได้รับการกระตุ้นจากปัจจัยภายนอก และพบว่าปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่ทำการทดลองไม่สอดคล้องกับระดับการแสดงออกของยีน HbPAL ที่แสดงออก ซึ่งโดยปกติแล้วสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารชีวเคมีที่ตอบสนองต่อความเครียดต่างๆ ได้แก่ การเข้าทำลายของโรค สภาวะที่ปริมาณของธาตุเหล็กต่ำ สภาวะอุณหภูมิต่ำ การเกิดบาดแผล (Dixon และ Paiva, 1995) และมีบทบาทในกระบวนการสร้างลิกนิน (lignification) ตรงส่วนบริเวณที่เกิดรอยเชื่อมหลังจากทำการทาบกิ่ง (Buchloh, 1960) และยังมีผลต่อการเข้ากันไม่ได้ระหว่างกิ่งพันธุ์ดีกับต้นตออีกด้วย (Evans และ Rasmussen, 1994) จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ และการแสดงออกของยีน PAL เพื่อศึกษาถึงความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อในพืชตระกูลพ룬ของ Dos Santos Pereira และคณะ (2014) รายงานว่า ต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีที่มีความสำเร็จในการเกิดรอยเชื่อมมีการแสดงออกของยีน PAL ที่แตกต่างกัน แต่ไม่มีความแตกต่างกันของกิจกรรมของเอนไซม์ PAL ทั้งในต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Gibon และคณะ (2004) และ Osuna และคณะ (2007) ที่รายงานว่า การเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีน PAL ไม่ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ PAL ซึ่งอาจเป็นผลอันเนื่องมาจากกระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีนจากการดัดแปลงโมเลกุลของโปรตีนหลังการแปลรหัส (posttranslational modification)

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของกิ่งพันธุ์หลังการติดตามต้นตอพันธุ์ต่างๆ เพื่อดูถึงความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีน และการเจริญเติบโตของต้นยางพารา ในกิ่งพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 ที่ติดตามต้นตอพันธุ์ต่างๆ พบว่าในกิ่งพันธุ์ RRIM 600 ที่ติดตามต้นตอยางพาราพันธุ์ RRIM 600 (RRIM 600/ RRIM 600) ซึ่งเป็นลักษณะการติดตามแบบ homograft มีการเจริญเติบโต และการพัฒนาของตาน้อยที่สุดไม่ว่าจะเป็น ผลสำเร็จของการติดตาม ความสูงของยอดที่แตกใหม่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของยอดที่แตกใหม่ และจำนวนใบ ในกรณีของ RRIM 600/ RRIM 600 ที่มีการเจริญเติบโตของกิ่งตาน้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการติดตามต้นตอพันธุ์พื้นเมืองบางรัก (B), พันธุ์พื้นเมืองควนมดแดง (K) และพันธุ์ RRIM623 ซึ่งส่งเสริมให้กิ่งพันธุ์ RRIM 600 มีการเจริญเติบโตที่ดี เนื่องจากต้นตอพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์ RRIM 623 มีระบบรากที่แข็งแรง และมีการเจริญเติบโตของลำต้นก่อนการติดตามที่สมบูรณ์กว่าต้นตอพันธุ์ RRIM 600 นอกจากนี้การเจริญเติบโตของกิ่งพันธุ์ RRIM 600 หลังการติดตามต้นตอพันธุ์ต่างๆ ไม่สอดคล้องกับระดับการแสดงออกของยีน *HbPAL* โดยกิ่งพันธุ์ที่ติดตามต้นตอพื้นเมืองพันธุ์ RRIM 623 มีระดับการแสดงออกของยีนสูงที่สุด แต่มีเพียงค่าของจำนวนวันแตกยอดใหม่เท่านั้นที่มีการแตกยอดใหม่ช้ากว่ากิ่งพันธุ์ที่ติดตามต้นตอพันธุ์อื่นๆ สำหรับในกิ่งพันธุ์ RRIT 251 ที่ติดตามต้นตอยางพาราพันธุ์พื้นเมืองบางรัก (B) มีการเจริญเติบโต และการพัฒนาของตาน้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญเติบโตบนต้นตอพันธุ์อื่นๆ รวมทั้ง RRIT 251/ RRIT 251 (homograft) สอดคล้องกับการแสดงออกของยีน *HbPAL* ที่มีระดับการแสดงออกที่สูงที่สุด แม้ว่ากิ่งพันธุ์ RRIM 600 ที่ทำการติดตามต้นตอพันธุ์ RRIM 623 และกิ่งพันธุ์ RRIT 251 ที่ติดตามต้นตอยางพาราพันธุ์พื้นเมืองบางรัก (B) จะมีการแสดงออกของยีนสูงที่สุด แต่ระดับการแสดงออกของยีนยังไม่สามารถบ่งบอกได้ชัดเจนถึงความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ของยางพาราทั้งสองพันธุ์ที่ทำการศึกษานี้ซึ่งอาจได้รับปัจจัยทางพันธุกรรม และอิทธิพลของต้นตอที่ส่งผลให้กิ่งพันธุ์นั้นมีการเจริญเติบโตได้ดี แม้มีการแสดงออกของยีนที่สูง Mng' omba และคณะ (2008) ศึกษาใน *U. kirikiana* และรายงานว่าการทาบกิ่งแบบ homograft ที่เกิดความล้มเหลวในการประสานกันของรอยเยื่ออาจเกิดขึ้นจากความแตกต่างกันในพันธุกรรมของต้นตอเพราะ *U. kirikiana* เป็นพืชที่มีดอกตัวผู้ และดอกตัวเมียแยกกันอยู่คนละต้น (dioecious) เมล็ดจึงมีความหลากหลายทางพันธุกรรม จากผลการโคลนยีน *PAL* ในยางพารายังพบว่ามีบริเวณอนุรักษ์ของ Posttranslational phosphorylation ที่เป็นตำแหน่งของกรดอะมิโน VAKRVLT ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ว่ายีนที่โคลนได้ในการศึกษาครั้งนี้คือยีน *HbPAL2* Irisarri และคณะ (2016) ได้รายงานไว้ว่ายีน *ParPAL1* ในพืชตระกูล Prunus เป็นยีนที่มีบทบาทในการกำหนดความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีมากกว่ายีน

*PAL2* (Dos Santos Pereira *et al.*, 2014, Irisarri *et al.*, 2016) เนื่องจากยีน *PAL* จะมีบทบาทในการผลิตสารประกอบฟีนอลิกแล้ว ยังเกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนินที่บริเวณของผนังเซลล์ และการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) (Oh *et al.*, 2003, Raes *et al.*, 2003, Olsen *et al.*, 2008) โดยกระบวนการเกิดลิกนิน (lignification) ของผนังเซลล์นั้นสำคัญต่อรูปแบบของการเกิดรอยเชื่อมที่สมบูรณ์ตัวอย่างเช่น ในการเกิดรอยเชื่อมของ pear- quince ซึ่งตัวบ่งชี้ของการเกิดลิกนิน และการสร้าง middle lamella ส่งผลให้เกิดรอยเชื่อมที่ไม่สมบูรณ์ pear- quince ที่เนื้อเยื่อมีความเข้ากัน และมีการสร้างรอยเชื่อมที่สมบูรณ์ ลิกนินที่เป็นองค์ประกอบภายในโครงสร้างของผนังเซลล์บริเวณที่เกิดรอยเชื่อมเปรียบได้กับตัวยึดระหว่างเซลล์ภายนอกที่เกิดการเชื่อมประสานกันของเนื้อเยื่อในทางตรงกันข้ามผนังเซลล์ที่อยู่ใกล้กันของเซลล์ที่มีความล้มเหลวในการเกิดรอยเชื่อมของเนื้อเยื่อ จะไม่มีลิกนินเป็นองค์ประกอบในการยึดกันระหว่าง 2 เซลล์ภายในโครงสร้างผนังเซลล์ และจะเชื่อมติดกันหรือยึดกันด้วยเส้นใยเซลลูโลส (cellulose) เพียงเท่านั้น (Buchloh, 1960) การที่ยีน *PAL* มีการแสดงออกสูงในพืชที่เกิดความล้มเหลวของการเกิดรอยเชื่อมสามารถอธิบายได้ว่า หากมีการแสดงออกของยีน *PAL1* สูงจะทำให้การสร้างลิกนินโดยการควบคุมของยีน *PAL2* ถูกขัดขวาง และสารตั้งต้นในวิถีการสังเคราะห์ phenylpropanoid จะถูกนำไปใช้ในการสร้างแอนโทไซยานินซึ่งจัดเป็นสารประกอบฟีนอลิกชนิดหนึ่ง ดังนั้นยีน *PAL1* จึงถูกกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญในพืชที่เกิดความล้มเหลวในการเกิดรอยเชื่อม (Dos Santos Pereira *et al.*, 2014; Irisarri *et al.*, 2016) เนื่องจากเป็นการศึกษาครั้งแรกของการแสดงออกของยีน *PAL* ต่อความเข้ากันได้ของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีในยางพารา และไม่มีตัวเปรียบเทียบของลักษณะ compatibility และ incompatibility ในการทดลองครั้งนี้แตกต่างจากพืชในตระกูล Prunus ได้แก่ พืช พลัม และแอปริคอต ซึ่งมีการศึกษาถึงความเข้ากันได้ของต้นตอและกิ่งพันธุ์ค่อนข้างมาก มีตัวเปรียบเทียบของลักษณะ compatibility และ incompatibility ระหว่างต้นตอและกิ่งพันธุ์ที่ชัดเจน เช่นในการศึกษาของ Dos Santos Pereira และคณะ (2014) ที่ศึกษาการทาบกิ่งของพืชบนต้นตอพืช (compatible) เปรียบเทียบกับการทาบกิ่งพืชบนต้นตอแอปริคอต (incompatible) ที่เกิดความล้มเหลวในการเกิดรอยเชื่อม ซึ่งเป็นตัวเปรียบเทียบที่เห็นได้ชัดเจนทำให้เห็นว่าการแสดงออกของยีน *PAL1* และ *PAL2* มีความสัมพันธ์กับลักษณะการเกิด incompatibility นอกจากนี้การศึกษาของรัชนิกร และจรัสศรี (2555) พบว่าถึงแม้จะพบความแตกต่างทางพันธุกรรมค่อนข้างมากระหว่างกิ่งตอพันธุ์ RRIM 600 และยางพาราพันธุ์พื้นเมืองที่ใช้เป็นต้นตอ โดยพบค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของต้นกล้าพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์ RRIM 600 อยู่ในช่วงระหว่าง 0.468-0.952 แต่ไม่พบความแตกต่างของความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อ กับต้นตอทุกกลุ่มพันธุ์ อย่างไรก็ตามการเก็บข้อมูลในการศึกษานี้สามารถทำได้เพียง 3 เดือน

หรือ 12 สัปดาห์หลังการติดตา เนื่องจากมีข้อจำกัดในเรื่องของเวลาที่ทำการศึกษา อาจไม่เพียงพอต่อการสรุปผลจึงต้องทำการเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตของกิ่งตาดที่แตกออกมาในระยะเวลาที่นานมากกว่านี้ เนื่องจากการเกิดความไม่เข้ากันของเนื้อเยื่อ หรืออิทธิพลของต้นตอต่อกิ่งพันธุ์ดี อาจใช้เวลาค่อนข้างนาน เช่นเดียวกันกับการทดลองของ Dos Santos Pereira และคณะ (2014) ทำการทดลองในพืชตระกูล Prunus ที่ทำการทาบกิ่งไปแล้ว 2-3 ปี จึงจะเห็นการเปลี่ยนแปลงของการเจริญเติบโตที่ผิดปกติชัดเจนในต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีที่เกิดความล้มเหลวของการเกิดรอยเชื่อม การศึกษาใกล้เคียงความเข้ากันได้ระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีนั้นมีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง มีรายงานว่าหากพบสาร polyphenols บริเวณรอยต่อของเนื้อเยื่อระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีสูง จะส่งผลต่อการลำเลียงฮอร์โมนออกซิน ซึ่งมีบทบาทต่อการพัฒนาของท่อลำเลียงอาหารระหว่างต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี และยังมีผลต่อการสร้างลิกนินให้น้อยลงอีกด้วย (Gainza *et al.*, 2015)

## บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ

### การโคลนยีน และศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAL* ในยางพารา

จากการโคลนยีน *PAL* โดยใช้ cDNA ของยางพารา พบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *HbPAL* มีความยาวทั้งสิ้น 2,145 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นโปรตีนได้ขนาด 721 กรดอะมิโน เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *HbPAL* ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากพืชชนิดอื่นๆ ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *HbPAL* มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAL* ในมันสำปะหลังมากที่สุดถึง 93 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของยีน *HbPAL* พบตำแหน่งของกรดอะมิโนบริเวณอนุรักษของ phenylalanine/histidine ammonia lyase บริเวณตำแหน่งกรดอะมิโน GTITASGDLVPLSYIA (196-211) และที่ตำแหน่งเดียวกันพบบริเวณอนุรักษของ MIO (3,5-dihydro-5-methylidene-4H-imidazol-4-one) บริเวณตำแหน่งกรดอะมิโน ASG (200-202) ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ใช่โปรตีนทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ (coenzyme) ช่วยเร่งการเกิดปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังพบตำแหน่งของกรดอะมิโน VAKRVLTT (541-548) ซึ่งเป็นตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ ATP ในยางพารา และยังเป็นบริเวณที่เป็นตัวบ่งชี้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAL* ในยางพาราที่ทำการโคลนได้เป็นยีน *PAL* ในไอโซฟอร์มที่ 2 (*PAL2*) โดยยีน *PAL2* ส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างลิกนิน

**การแสดงออกของยีน *HbPAL* ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และการเจริญเติบโตของยางพาราที่ได้รับการติดตามต่อความสามารถในการเข้ากันได้ของต้นตอยางพาราพันธุ์พื้นเมืองพันธุ์ต่างๆ กับกิ่งพันธุ์ดีพันธุ์ RRIM600 และ RRIT251**

จากการแสดงออกของยีน *HbPAL* ในต้นยางพาราหลังทำการติดตามในระยะ 0, 7, 14, 21 และ 28 วัน พบว่ายีน *HbPAL* มีระดับการแสดงออกของยีนสูงที่สุดที่ 7 วันหลังจากทำการติดตามโดยในกิ่งตอพันธุ์ดีพันธุ์ RRIM 600 ที่ทำการติดตามต้นตอพันธุ์ RRIM 623 (RRIM 600/ RRIM 623) มีระดับการแสดงออกของยีน *HbPAL* สูงที่สุด โดยมีค่าการแสดงออกของยีนมากกว่า 19 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับต้นยางที่ไม่ได้รับการติดตาม (control) สำหรับในกิ่งตอพันธุ์ดีพันธุ์ RRIT 251 กิ่งตอที่ทำ



การติดตามบนต้นตอพันธุ์พื้นเมืองบางรัก (RRIT 251/ B) มีระดับการแสดงออกของยีน *HbPAL* สูงที่สุด โดยมีค่าการแสดงออกของยีนมากกว่า 2.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับต้นยางที่ไม่ได้รับการติดตาม (control) หลังจากการติดตามไปแล้ว 14 วัน ระดับการแสดงออกของยีน *HbPAL* มีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วทั้งในกิ่งพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 ซึ่งกิ่งพันธุ์ RRIM 600 มีระดับการแสดงออกของยีน *HbPAL* ลดลงมากกว่ากิ่งพันธุ์ RRIT 251 แต่ปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมดที่ทำการทดลองไม่สอดคล้องกับระดับการแสดงออกของยีน *HbPAL* และปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมดในยางพาราที่ทำการติดตามด้วยกิ่งตอพันธุ์ดีพันธุ์ RRIM 600 และพันธุ์ RRIT 251 บนต้นตอพันธุ์ RRIM 623, พันธุ์พื้นเมืองบางรัก (B) และพันธุ์พื้นเมืองควนמדแดง (K) เปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดกับต้นยางที่ไม่ได้รับการติดตาม พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และจากการศึกษาการเจริญเติบโต และการพัฒนาในกิ่งพันธุ์ดีพันธุ์ RRIM 600 ที่ทำการติดตามบนต้นตออย่างพาราพันธุ์ต่างๆ พบว่าในกิ่งพันธุ์ดีพันธุ์ RRIM 600 ที่ทำการติดตามบนต้นตออย่างพาราพันธุ์ RRIM 600 (RRIM 600/ RRIM 600) มีการเจริญเติบโต และการพัฒนาของตาน้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ การเจริญเติบโต และการพัฒนาของตาที่ทำการติดตามบนต้นตอพันธุ์พื้นเมืองบางรัก (B) พันธุ์พื้นเมืองควนמדแดง (K) และพันธุ์ RRIM 623 จากผลระดับการแสดงออกของยีน พบว่าไม่สอดคล้องกับระดับการแสดงออกของยีน *HbPAL* โดยกิ่งพันธุ์ดีที่ติดตามบนต้นตอพันธุ์ RRIM 623 มีระดับการแสดงออกของยีนสูงที่สุด แต่มีเพียงค่าของจำนวนวันแตกยอดใหม่เท่านั้นที่มีการแตกยอดใหม่ช้ากว่ากิ่งพันธุ์ที่ติดตามบนต้นตอพันธุ์อื่นๆ สำหรับในกิ่งตอพันธุ์ดีพันธุ์ RRIT 251 ที่ติดตามบนยางพาราพันธุ์พื้นเมืองบางรัก (B) มีการเจริญเติบโต และการพัฒนาของตาน้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ การเจริญเติบโต และการพัฒนาของตาที่ทำการติดตามบนต้นตอพันธุ์ RRIM 623 และพันธุ์พื้นเมืองควนמדแดง (K) รวมถึงพันธุ์ RRIT 251 ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกของยีน *HbPAL* ที่มีระดับการแสดงออกที่สูงที่สุด ถึงอย่างไรก็ตามแต่ระดับการแสดงออกของยีน *HbPAL* และปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมดที่ทำการศึกษารั้งนี้ ยังไม่สามารถบอกถึงความสามารถในการเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อระหว่างต้นตอพันธุ์ต่างๆ กับกิ่งพันธุ์ดีพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 ได้อย่างชัดเจน เมื่อพิจารณาถึงการเจริญเติบโตของต้นยางภายในแปลงหลังจากทำการติดตาม และตัดยอดต้นตอ เพื่อให้ตายนั่นแตกออกมาใหม่ กิ่งพันธุ์ดี RRIM 600 มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่ากิ่งพันธุ์ดี RRIT 251 ถึงแม้ว่าจะมีระดับการแสดงออกของยีน *HbPAL* สูงกว่า RRIT 251

### ข้อเสนอแนะ

1. ในการทำการทดลองขนาดของต้นตอที่ทำการติดตามีผลต่อความสำเร็จของการติดตาม โดยขนาดของต้นตอควรมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 1 เซนติเมตร
2. ควรทำการศึกษาบทบาทของยีน *PAL* ในไอโซฟอร์มอื่นๆ ได้แก่ ไอโซฟอร์มที่ 1, ไอโซฟอร์มที่ 2, ไอโซฟอร์มที่ 3 และไอโซฟอร์มที่ 4 เพื่อความเข้าใจถึงบทบาท และหน้าที่มากยิ่งขึ้น
3. การทำการทดลองเพื่อดูระดับการแสดงออกของยีน *PAL* ควรทำการทดลองในสภาพโรงเรือนที่ควบคุมปัจจัยของสภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น การเข้าทำลายของโรค, อุณหภูมิ และธาตุอาหาร เป็นต้น เนื่องจากปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อการแสดงออกของยีน *PAL*
4. ควรทำการเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตของกิ่งตาที่แตกออกมาในระยะเวลาที่นานมากกว่านี้ เนื่องจากการเกิดความไม่เข้ากันของเนื้อเยื่อ หรือผลของต้นตอต่อกิ่งพันธุ์ดี อาจใช้เวลาค่อนข้างนาน
5. สำหรับการศึกษความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีในยางพารา อาจต้องมีการศึกษาหาต้นยางที่เกิดความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อ (compatibility) และต้นยางที่เกิดความล้มเหลวในการเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อ (incompatibility) ให้ชัดเจนก่อนการศึกษาต่อไป

## เอกสารอ้างอิง

กฤษณี พิสิฐศุภกุล. 2559. สถานการณ์ยางพาราปี 2558 และแนวโน้มราคาปี 2559. ธนาคารแห่งประเทศไทย.

กรกช นาคคะนอง. 2558. บทปฏิบัติการวิชาชีวโมเลกุลของพืชปลูก (510- 602). ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ 45 หน้า.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2556. การขยายพันธุ์พืช. กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตร และ สหกรณ์ 95 หน้า.

จรินทร์ การะนัด, สุนทร แก้วนวลศรี และนิพนธ์ บรรจงกิจ. 2540. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง ต้นตอกับตาของยางบางพันธุ์. รายงานผลการวิจัยยางพารา 16 หน้า.

จิราพร ชัยวรกุล. 2553. ผลของสภาพะการให้ความร้อนต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และสมบัติการกำจัดอนุมูลอิสระของมะระขี้นก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

ณฤทธิ์ ศษรัตน์. 2559. ศึกษาการเข้ากันได้ของต้นตอยางพาราที่ทนทานต่อโรครากขาวกับพันธุ์ RRIM 600. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นงพร สิทธิเจริญชัย. 2535. เทคนิคการขยายพันธุ์พืช. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

ปยุตยาพร บริเวธานันท์. 2555. การโคลน การแสดงออก และการวิเคราะห์คุณสมบัติของยีน AGAMOUS ในสบู่ดำ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- พิทักษ์ ใจคง และสุภาลัย ไชยสุต. 2553. การผสมพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง.
- พวงผกา สุนทรชัยนาคแสง. 2548. กายวิภาค และสัณฐานวิทยาของพืชดอก. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ทอป.
- รัชนีกร แก้วจุลกาญจน์ และจรัสศรี นวลศรี. 2555. การวิเคราะห์พันธุกรรมของยางพาราพันธุ์พื้นเมืองโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอฟดี และการศึกษาอิทธิพลของต้นตอพื้นเมืองต่อการเจริญเติบโตของกิ่งพันธุ์ RRIM600. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 43: 209-212.
- วัลลภ พรหมทอง. 2543. เคล็ดลับการขยายพันธุ์พืชเป็นอาชีพ. กรุงเทพฯ: มติชน 102 หน้า.
- วิชา ธิติประเสริฐ, มานิตย์ ใจจนกรรจ์ และดวงเดือน ศรีโพธา. 2545. ฐานข้อมูลพันธุ์พืช: ยางพารา (Plant Germplasm Database: Para rubber). กรุงเทพฯ : ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด 120 หน้า.
- วีระพงศ์ ลูลิตานนท์. 2551. Real Time Polymerase Chain Reaction. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สถาบันวิจัยยาง. 2554. คำแนะนำพันธุ์ยางปี 2554. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 49 หน้า.
- สำนักพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. 2558. สถานการณ์ยางพาราและการปรับตัวของเกษตรกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ.
- สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน). 2545. การขยายพันธุ์ยางพารา. เข้าถึงจาก <http://www.arda.or.th/kasetinfo/south/para/controller/01-04-02.php>. (เข้าถึงเมื่อ 18 มีนาคม 2559).

อโณทัย โศคาธิกรณ. 2549. เอกสารประกอบประชุมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง Introduction to Real time-PCR and its applications. ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อารมณั์ โรจน์สุจิตร, เพียวร้ ร่มรินสุขารมย์ และอุไร จันทรประทีน. 2556. ประสิทธิภาพสารเคมีต่อการควบคุมโรครากขาวของยางพารา. วารสารยางพารา 34(14): 11-19.

อารมณั์ โรจน์สุจิตร, สโรชา กรีธาพล, วันเพ็ญ พฤษวีวัฒน์, วลัยพร ศศิประภา, ประภา พงษ์อุทธา และปราโมทย์ คำพุทธ. 2558. ประเมินความสูญเสียทางเศรษฐกิจของยางพาราที่มีสาเหตุจากโรครากขาวในพื้นที่ปลูกยางภาคใต้ตอนบนของประเทศไทย. วารสารยางพารา 36(23): 3-14.

อมรรัตน์ พรหมบุญ, สุนันทา รัตนานโ และทิพย์มนต์ ภัทรนคร. 2550. พิษไซยาไนด์. เข้าถึงจาก [http://www.rdi.ku.ac.th/kufair50/plant/03\\_plant/03\\_plant.html](http://www.rdi.ku.ac.th/kufair50/plant/03_plant/03_plant.html). (เข้าถึงเมื่อ 18 มีนาคม 2559).

อยุทธิ นิสสกา และเสมอใจ ชื่นจิตต์. 2554. การประเมินความสูญเสียทางเศรษฐกิจจากรโรครากขาวในยางพาราในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย สงขลา: รายงานการวิจัยคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อุไร จันทรประทีน, บัญญัติ สิทธิผล, ประภา พัฒนากุล, นริสา จันทรเรือง และประสาน ศุภผล. 2538. การตัดพันธุ์ต้านทานโรครากขาว. รายงานการวิจัยสถาบันวิจัยยาง. กรมวิชาการเกษตร.

Adesegun, S. A., Fajana, A., Orabueze, C. I. and Coker, H. A. B. 2007. Evaluation of Antioxidant Properties of *Phaulopsis Fascisepala* C.B.CI. (*Acanthaceae*). Oxford Journals 6: 227- 213.

Akimoto, S., Ishino, T., Terada, T., Samejima, M. and Kamoda, S. 2013. A *phenylalanine ammonia-lyase* gene (*ErPAL1*) from *Eucalyptus robusta*: molecular cloning, expression and characterization. Bull. Tokyo Univ. For. 128: 121- 137.

- Allwood, E. G., Davies, D. R., Gerrish, C., Ellis, B. E. and Bolwell, P. G. 1999. Phosphorylation of phenylalanine ammonia-lyase: evidence for a novel protein kinase and identification of the phosphorylated residue. *FEBS Letters* 457: 47- 52.
- Aloni, B., Cohen, R., Karni, L., Aktas, H. and Edelstein. 2010. Hormonal signaling in rootstock-scion interaction. *Scientia Horticulturae* 127: 119- 126.
- Buchloh, G. 1960. The lignification in stock-scion junctions and its relation to compatibility. In: Pidham JB (ed.) *Phenolic in Plants in Health and Disease*. Pergamon Press, Oxford, 67-68.
- Cardinal, A. B. B., Goncalves, P. S. and Martins, A. L. M. 2007. Stock-scion interactions on growth and rubber yield of *Hevea brasiliensis*. *Science Agriculture* 64: 235-240.
- Considine, J. A. 1983. Concepts and practice of use of plant growth regulating chemicals in viticulture. *Plant Growth Regulation*: 89- 183.
- Darikova, J. A., Savva, Y. V., Vaganov, E. A. Grachev, A. M. and Kuznetsova, G. V. 2011. Grafts of woody plants and the problem of incompatibility between scion and rootstock (a review). *Journal of Siberian Federal University* 4: 54- 63.
- Dixon, R. A. and Paiva, N.L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1085- 1097.
- Dos Santos Pereira, I., Silva Messias, R., Diniz Campos, Â., Errea, P., Corrêa Antunes, L. E., Fachinello, J. C. and Pina, A. 2014. Growth characteristics and phenylalanine ammonia-lyase activity in peach grafted on different *Prunus* spp. *Biologia Plantarum* 58: 114- 120.

- Ermel, F. F., Kervella, J., Catesson, A. M. and Poëssel J. L. 1998. Localized graft incompatibility in pear/quince (*Pyrus communis/ Cydonia oblonga*) combinations: multivariate analysis of histological data from 5-month-old grafts. *Tree Physiology* 19: 645- 654.
- Errea, S., Felipe, A., Treutter, D. and Feucht, W. 1994. Flavanol accumulation in apricot grafts as a response to incompatibility stress. *Acta Horticulturae* 381: 498- 501.
- Errea, P. 1998. Implications of phenolic compounds in graft incompatibility in fruit tree species. *Scientia Horticulturae* 74: 195- 205.
- Errea, P., Garay, L. and Marin, J. A. 2001. Early detection of graft incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca*) using in vitro techniques. *Physiologia Plantarum* 112:135- 141.
- Evans, G. E. and Rasmussen, H. P. 1972. Anatomical changes in developing graft unions of *Juniperus*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 97: 228- 32.
- Evrenosoglu, Y., Alan, O. and Ozdemir, N. 2010. Leaf phenolic content of some squash rootstocks used on watermelon (*Citrullus lanatus* (thunb.) Matsum and Nakai) growing and phenolic accumulation on grafted cultivar. *African Journal of Agricultural Research* 5: 732- 737.
- Gainza, F., Opazo, I., and Muñoz, C. 2015. Graft incompatibility in plants: metabolic changes during formation and establishment of the rootstock/scion union with emphasis on *Prunus* species. *Chilean Journal of Agricultural Research* 75.

- Gao, J., Zhang, S., Cai, F., Zheng, X., Lin, N., Qin, X., Ou, Y., Gu, X., Zhu, X., Xu, Y. and Chen, F. 2012. Characterization and expression profile of a *phenylalanine ammonia lyase* gene from *Jatropha curcas* L. *Molecular Biology Reports* 39 (4): 3443- 3452.
- Gibon, Y., Blaesing, O. E., Hannemann, J., Carillo, P., Höhne, M., Hendriks, J. H. M., Palacios, N., Cross, J. Selbig, J. and Stitt, M. 2004. A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *Plant Cell* 16: 3304-3325.
- Goncalves, P. S. and Martins, A. L. M. 2002. Combination ability effects of clonal rootstock and scion in rubber trees (*Hevea*). *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 2: 445- 452.
- Harkin, J. M. and Obst, J. R. 1973. Lignification in trees: Indication of exclusive peroxidase participation. *Science* 180: 296- 298.
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T. and Geneve, R. L. 2010. Principles of grafting and budding. *Plant Propagation* 2: 415- 463.
- Hudina, M., Orazem, P., Jakopic, J. and Stampar, F. 2014. The phenolic content and its involvement in the graft incompatibility process of various pear rootstocks (*Pyrus communis* L.). *Plant Physiology* 171: 71- 84.
- Irisarri, P., Zhebentyayeva, T., Errea, P. and Pina, A. 2016. Differential expression of phenylalanine ammonia lyase (*PAL*) genes implies distinct roles in development of graft incompatibility symptoms in *Prunus*. *Scientia Horticulturae* 204: 16- 24.



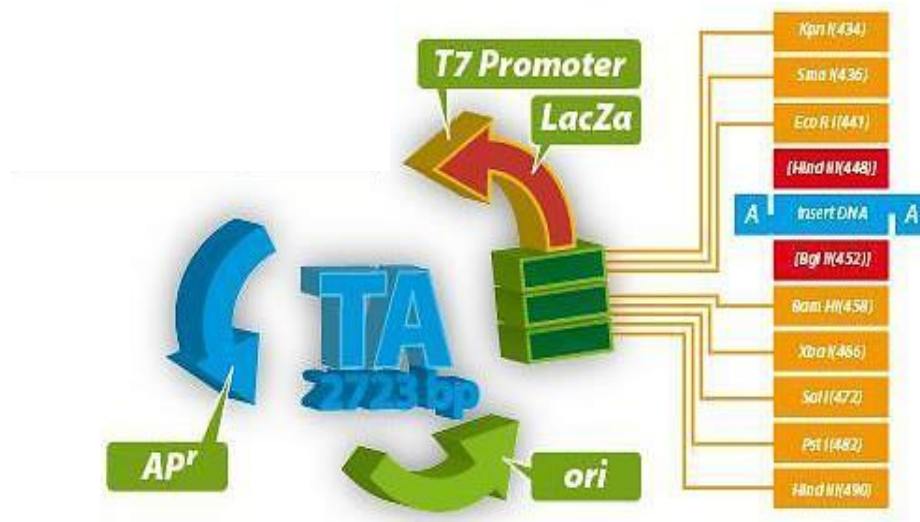
- Jin, Q., Yao, Y., Cai, Y. and Lin, Y. 2013. Molecular cloning and sequence analysis of a *phenylalanine ammonia-lyase* gene from *Dendrobium*. PLoS ONE 8(4): e62352.
- Jonard, R., Lukman, D., Schall, F. and Villemur, P. 1990. Early testing of graft incompatibilities in apricot and lemon trees using in vitro callus techniques. *Scientia Horticulturae* 53: 117- 128.
- Kaewchai, S. and Soyong, K. 2010. Application of biofungicides against *Rigidoporus microporus* causing white root disease of rubber tree. *Agricultural Technology* 6(2): 349- 363.
- Kubota, N. H., Yakushiji, H., Nishiyama, N., Mimura, H. and Shimamura, K. 2001. Phenolic contents and L-phenylalanine ammonia-lyase activity in peach fruit as affected by rootstocks. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 70: 151- 156.
- Laursen, T., Møllere, B. L. and Bassard, J. E. 2015. Plasticity of specialized metabolism as mediated by dynamic metabolons. *Trends Plant Science* 20(1): 20- 32.
- Leng, P. and Qui, J. X. 2003. Effect of anthocyanin on David peach (*Prunus davidiana* Franch) under low temperature stress. *Horticultural Science* 97: 27- 39.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ . *Methods* 25: 402- 408.
- MacDonald, M. J. and D' Cunha, G. B. 2007. A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochemistry and Cell Biology* 85(3): 273- 282.

- Mngomba, S. A., du Toit, E. S. and Akinnifesi, F. K. 2008. The relationship between graft incompatibility and phenols in *Uapaca kirkiana* Muell Arg. *Scientia Horticulturae* 117: 212- 218.
- Oh, S., Park, S. and Han, K. H. 2003. Transcriptional regulation of secondary growth in *Arabidopsis thaliana*. *Experimental Botany* 54: 2709- 2722.
- Olsen, K. M., Lea, U. S., Slimestad, R., Verheul, M. and Lillo, C. 2008. Differential expression of four *Arabidopsis* *PAL* genes; *PAL1* and *PAL2* have functional specialization in abiotic environmental-triggered flavonoid synthesis. *Plant Physiology* 165: 1491- 1499.
- Osuna, D., Usadel, B., Morcuende, R., Gibon, Y., Bläsing, O. E., Höhne, M., Günter, M., Kamlage, B., Trethewey, R., Scheible, W. R. and Stitt, M. 2007. Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal* 49: 463- 91.
- Pina, A. and Errea, P. 2005. A review of new advances in mechanism of graft compatible - incompatible in *Prunus* spp. *Scientia Horticulturae* 106:1- 11.
- Pina, A. and Errea, P. 2008. Differential induction of *phenylalanine ammonia-lyase* gene expression in response to *in vitro* callus unions of *Prunus* spp. *Plant Physiology* 165: 705- 714.
- Raes, J., Rohde, A., Christensen, J. H., Van de Peer, Y. and Boerjan, W. 2003. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133: 1051- 1071.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 2003. Molecular cloning: a laboratory manual 3<sup>rd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santamour, F. S. Jr. 1983. Cambial peroxidase patterns in *Quercus* related to taxonomic classification and graft compatibility. *Bul. Torrey Bot. Club* 110: 280- 286.
- Santamour, F. S. Jr., McArdle, A. J. and Jaynes, R. A. 1986. Cambial isoperoxidase patterns in castanea. *Environmental Horticulture* 4(1): 16-18.
- Shui, G., Leong, L. P. and Wong, S. P. 2005. Rapid screening and characterization of antioxidants of *Cosmos caudatus* using liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of chromatography* 827(1): 127- 38.
- Simon, A. and Elsa, S. 2007. Histological Evaluation of Early Graft Compatibility in *Uapaca kirkiana* Muell Arg. Scion/Stock Combinations. *Horticultural Science* 42(3): 732- 736.
- Simon, A., Elsa, S. and Festus, K. 2008. Early recognition of graft compatibility in *Uapaca kirkiana* Muell Arg. clones, provenances and species. *Agroforestry Systems* 74: 173- 183.
- Sobhana, P. Gopalakrishnan, J., Jacob, J., Sethuraj, M.R. 2001. Physiological and biochemical aspects of stock-scion interaction in *Hevea brasiliensis*. *Indian Journal of Natural Rubber Research* 14(2): 131- 136.
- Sullivan, M. L. 2009. *Phenylalanine ammonia lyase genes* in red clover: expression in whole plants and in response to yeast fungal elicitor. *Biologia Plantarum* 53: 301- 306.

- Usenik, U., Krska, B., Vivan, M. and Stampar, F. 2006. Early detection of graft incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca* L.) using phenol analyses. *Scientia Horticulturae* 109: 332- 338.
- Venkatachalam, L., Thanessm, L. and Thulaseedharan, A. 1999. A rapid and efficient method for isolation of RNA from bark tissue of *Hevea brasiliensis*. *Current Science* 77(5): 635-637.
- Yu, H. N., Liu, X. Y., Gao, S., Han, X. J., Cheng, A. X. and Lou, H. X. 2014. Molecular cloning and functional characterization of a phenylalanine ammonia-lyase from liverwort *Plagiochasma appendiculatum*. *Plant Cell Tissue And Organ Culture* 117: 265- 277.

## ภาคผนวก



รูปที่ 1 แผนที่ของพลาสมิดเวคเตอร์ RBC TA cloning vector (RBC Bioscience, ไต้หวัน)

### การเตรียมสารสำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอ

#### 1) Extraction buffer สำหรับสกัดอาร์เอ็นเอปริมาตร 100 มิลลิลิตร

0.2 M NaCl	1.17	กรัม
0.1 M Tris-HCl (pH 7.0)	1.576	กรัม
0.01 M EDTA (pH 8.0)	0.372	กรัม
1.5% SDS	1.5	กรัม

ละลาย NaCl และ Tris-HCl ในบีกเกอร์จนหมด เติม EDTA ด้วยน้ำกลั่น พร้อมกับการวัด pH จนได้ค่า pH 8.0 EDTA จะละลายหมด หลังจากนั้นเติม SDS รวจนสารละลายหมด (ปัมที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที เติม 2%  $\beta$ -mercaptoethanol และ 1.5% PVPP ก่อนนำมาใช้

#### 2) DEPC water (0.1% DEPC) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
DEPC	1	มิลลิลิตร

ในการเตรียม DEPC ต้องทำการเตรียมในตู้ดูดควัน เนื่องจาก DEPC เป็นสารก่อมะเร็ง เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ตูด DEPC 1 มิลลิลิตร ผสมสารให้เข้ากันโดยการ stirring เป็นเวลา 8 ชั่วโมง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที (ถ้ายังได้ กลิ่นของ DEPC ให้นำไปนึ่งฆ่าเชื้อใหม่อีกครั้ง)

#### 3) Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Chloroform	96	มิลลิลิตร
Isoamyl alcohol	2	มิลลิลิตร

#### 4) 8M LiCl ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

LiCl	16.952	กรัม
น้ำกลั่น		

ละลายสารด้วยน้ำกลั่นจนหมด และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 50 มิลลิลิตร นำไป นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที

## 5) 2M LiCl ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

LiCl	4.238	กรัม
น้ำกลั่น		

ละลายสารด้วยน้ำกลั่นจนหมด และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที

## 6) 3M Sodium acetate (pH 5.2) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Sodium acetate	40.824	กรัม
น้ำกลั่น	70	มิลลิลิตร

ละลายสารด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 70 มิลลิลิตร จนหมด วัด pH ให้ได้ค่า pH 5.2 และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที

**การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ**

## 1) Luria Bertani agar ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Tryptone	10	กรัม
Yeast-extract	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar	18	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ละลายสารทุกตัวยกเว้น agar ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร เมื่อสารละลายดี ปรับปริมาตรจนครบ 1,000 มิลลิลิตร และเติม agar นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที

2) Luria Bertani broth ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Tryptone	10	กรัม
Yeast-extract	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ละลายสารทุกตัวยกเว้น agar ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร เมื่อสารละลายดี ปรับปริมาตรจนครบ 1,000 มิลลิลิตร และเติม agar นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที

**การเตรียมสารสำหรับการเตรียม competent cell (Sambrook and Russell, 2001)**

1) 0.1 M Calcium chloride ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

CaCl <sub>2</sub>	1.12	กรัม
น้ำกลั่น	70	มิลลิลิตร

ละลาย CaCl<sub>2</sub> ในน้ำกลั่น 70 มิลลิลิตร เมื่อสารละลายดี ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที

2) 15% Glycerol: 0.1M Calcium chloride ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Glycerol	15	มิลลิลิตร
0.1M CaCl <sub>2</sub>	85	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดให้เป็นเนื้อเดียวกัน และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที

**การเตรียมสารที่ใช้ในการทำ Agarose gel electrophoresis**

1) TAE buffer ความเข้มข้น 50 เท่า ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

Tris base	121.1	กรัม
Acetic acid	28.5	มิลลิลิตร
0.5M Na <sub>2</sub> EDTA (pH 8.0)	50	มิลลิลิตร



ละลายสารให้เข้ากัน และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที ก่อนใช้นำมาเจือจางที่ความเข้มข้น 1 เท่า

2) TBE buffer ความเข้มข้น 5 เท่า ปริมาตร

Tris base	54	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
0.5M Na <sub>2</sub> EDTA (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร

ละลายสารให้เข้ากัน และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที ก่อนใช้นำมาเจือจางที่ความเข้มข้น 1 เท่า

**การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (ดัดแปลงจาก Shui *et al.*, 2006; จิราพร, 2553)**

อุปกรณ์

- 1) เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง
- 2) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
- 3) หลอดฝาเกลียว
- 4) Pipett และ pipettes tip

สารเคมี

- 1) Gallic acid
- 2) Follin-Ciocalteau reagents
- 3) Sodium carbonate ความเข้มข้นร้อยละ 10
- 4) 80% methanol

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1) เตรียม stock solution ของสารละลาย gallic acid ที่ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยการชั่งสาร gallic acid 0.01 กรัม ละลายด้วย 80% methanol 10 มิลลิลิตร กลับหลอดฝาเกลียวไปมา 2-3 ครั้ง และปรับปริมาตรสารละลาย gallic acid เป็น 25 มิลลิลิตร ด้วย 80% methanol

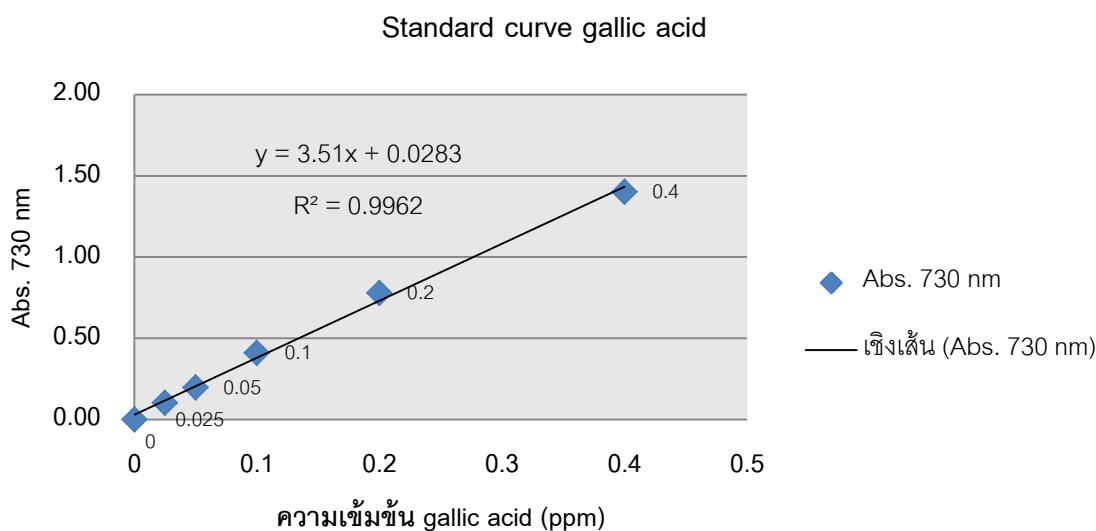
2) ปรับความเข้มข้นของสารละลาย gallic acid จาก stock solution ให้มีระดับความเข้มข้นเป็น 0.025, 0.05, 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการปิเปตสารละลาย gallic acid จาก stock solution ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดฝาเกลียวของสารละลาย gallic acid ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วย 80% methanol หลังจากนั้นปิเปตสารละลาย gallic acid ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในหลอดฝาเกลียวของสารละลาย gallic acid ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ความเข้มข้นอื่นๆ ทำเช่นเดียวกันนี้จนครบทุกความเข้มข้น

3) ควบน้ำกลั่นใส่หลอดฝาเกลียว 9.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย gallic acid ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ลงไปในหลอดฝาเกลียวแต่ละหลอดที่ระบุความเข้มข้นของ สารละลาย gallic acid ไว้ และเติมสารละลาย Follin-Ciocalteu reagents ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และวางหลอดไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

4) เติมสารละลาย Sodium carbonate ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

5) เขย่าสารให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง

6) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 730 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับหลอดควบคุม (เติม 80% methanol แทน gallic acid 0.5 มิลลิลิตร) และนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานของ gallic acid



**รูปที่ 2** กราฟมาตรฐานสารละลายกรดแกลลิกสำหรับคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในรูปของ GAE (gallic acid equivalent)

วิธีคำนวณ (Adesegun *et al.*, 2007)

สมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน  $y = 3.6129x + 0.0283$

เมื่อ	y	คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้
	3.6129	คือ ค่าความชันของกราฟ
	x	คือ ค่าที่ได้จากการคำนวณ
	0.0283	คือ ค่าคงที่ของสมการ (จุดตัดแกน y)

GAE (Gallic Acid Equivalent)

$$T = \frac{C \times V}{M}$$

T	คือ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อกรัม
x, C	คือ ค่าความเข้มข้นที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
V	คือ ปริมาณสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ มีหน่วยเป็นมิลลิลิตร
M	คือ น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ มีหน่วยเป็นกรัม



(A)



(B)



(C)



(D)

**รูปที่ 3** การเจริญเติบโต และการพัฒนาทางลำต้นของกิ่งต่าพันธุ์ RRIM 600 ที่ทำการติดตามต้นตอ  
 ย่างพาราพันธุ์พื้นเมืองบางรัก (A), ย่างพาราพันธุ์พื้นเมืองควนמדแดง (B), พันธุ์ RRIM 623 (C)  
 และต้นตอย่างพาราพันธุ์ RRIM 600 (D) ในภาพรวมหลังจากการแตกยอดใหม่ 12 สัปดาห์



(A)



(B)



(C)



(D)

**รูปที่ 4** การเจริญเติบโต และการพัฒนาทางลำต้นของกิ่งตาพันธุ์ RRIT 251 ที่ทำการติดตามต้นตอ  
 ยางพาราพันธุ์พื้นเมืองบางรัก (A), ยางพาราพันธุ์พื้นเมืองควนמדแดง (B), พันธุ์ RRIM 623 (C)  
 และต้นตอยางพาราพันธุ์ RRIT 251 (D) ในภาพรวมหลังจากการแตกยอดใหม่ 12 สัปดาห์

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวพรทิพย์ แสงศิลป์  
 รหัสประจำตัวนักศึกษา 5610620022  
 วุฒิการศึกษา  
 วุฒิ ชื่อสถาบัน ปีที่สำเร็จการศึกษา  
 วิทยาศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 2556  
 (เกษตรศาสตร์)

## ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

1. ทุนเรียนดี ปีงบประมาณ 2556 คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2. ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ ปีงบประมาณ 2557 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
3. ทุนสนับสนุนจากสถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร และทรัพยากรธรรมชาติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
4. ทุนสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ