



การตอบสนองทางสรีรวิทยาและการแสดงออกของยีน *P5CS* ที่เกี่ยวข้องกับการสะสม  
โพรลีนในสภาวะขาดน้ำของต้นกล้ายางพารา  
Physiological Responses and *P5CS* Gene Expression Involved in Proline  
Accumulation during Water Deficit Condition in Rubber Tree Seedling

อรวรรณ แก้วรักษา  
Orawan Kaewraksa

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

2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การตอบสนองทางสรีรวิทยาและการแสดงออกของยีน *P5CS* ที่เกี่ยวข้องกับการสะสม  
โพรลีนในสภาวะขาดน้ำของต้นกล้ายางพารา  
Physiological Responses and *P5CS* Gene Expression Involved in Proline  
Accumulation during Water Deficit Condition in Rubber Tree Seedling

อรวรรณ แก้วรักษา  
Orawan Kaewraksa

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

2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การตอบสนองทางสรีรวิทยาและการแสดงออกของยีน P5CS ที่เกี่ยวข้องกับการ  
สะสมโพรตีนในสภาวะขาดน้ำของต้นกล้วยพารา  
ผู้เขียน นางสาวอรรรณ แก้วรักษา  
สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....

.....ประธานกรรมการ

(ดร. เสาวภา ต้วงปาน)

(ดร. ธีญญ์วิช ธีญญ์วิวรรณ์)

.....กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ดร. เสาวภา ต้วงปาน)

.....

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. จรัสศรี นวลศรี)

(รองศาสตราจารย์ ดร. จรัสศรี นวลศรี)

.....

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กรกช นาคคนอง)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กรกช นาคคนอง)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ระวี เสียรวิภา)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็น  
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

.....

(ศาสตราจารย์ ดร. ดำรงค์ดี ฟาร์รุ่งแสง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(3)

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ .....

(ดร. เสาวภา ต้วंगปาน)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ .....

(นางสาวอรุวรรณ แก้วรักษา)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ  
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ .....

(นางสาวอรรณณ แก้วรักษา)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การตอบสนองทางสรีรวิทยาและการแสดงออกของยีน <i>P5CS</i> ที่เกี่ยวข้องกับการสะสมโพรลีนในสภาวะขาดน้ำของต้นกล้ายางพารา
ผู้เขียน	นางสาวอรวรรณ แก้วรักษา
สาขาวิชา	พืชศาสตร์
ปีการศึกษา	2561

### บทคัดย่อ

ระยะต้นกล้าของยางพาราเป็นช่วงที่ต้องการน้ำปริมาณที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต หากเกิดการขาดน้ำจะทำให้ต้นกล้าได้รับความเสียหาย การคัดเลือกพันธุ์ยางพาราที่มีลักษณะทนทานต่อความแห้งแล้งเพื่อใช้เป็นต้นตอยางพารา เป็นส่วนหนึ่งที่จะช่วยลดปัญหาความเสียหายที่เกิดขึ้นกับต้นกล้ายางพาราในสภาวะแห้งแล้ง พืชที่ได้รับน้ำในปริมาณที่ไม่เพียงพอจะเกิดการชะงักการเจริญเติบโต กระบวนการทางสรีรวิทยา และชีวเคมีมีการเปลี่ยนแปลง ในการทดลองนี้ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำในใบ การร่วงไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ ประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงของคลอโรฟิลล์ ปริมาณคลอโรฟิลล์สัมพันธ์ของต้นกล้ายางพาราพันธุ์ PB 5/51, RRIT 408, RRIM 623, RRIM 600, BPM 24 และ RRIT 251 ภายใต้สภาวะขาดน้ำในช่วงเวลาที่ต่างกันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน พบว่า เมื่อยางพารามีการขาดน้ำเป็นช่วงเวลานานมีการลดลงของปริมาณน้ำในใบพืช ประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงของคลอโรฟิลล์ และปริมาณคลอโรฟิลล์สัมพันธ์ และมีการร่วงไหลของสารอิเล็กโทรไลต์เพิ่มมากขึ้น โดยพบว่ายางแต่ละพันธุ์มีการตอบสนองที่แตกต่างกันไป จากการวิจัยในครั้งนี้อาจจำแนกพันธุ์ยางพาราที่มีศักยภาพในการทนทานต่อสภาวะขาดน้ำ คือ ยางพาราพันธุ์ RRIM 623, RRIT 408, RRIM 600 และ RRIT 251 ส่วนกลุ่มที่ไวต่อสภาวะขาดน้ำประกอบด้วยยางพาราพันธุ์ PB 5/51 และ BPM 24 จึงได้นำตัวแทนของยางพาราทั้งสองกลุ่มประกอบด้วยยางพาราพันธุ์ RRIM 623, RRIT 408 และ PB 5/51 มาศึกษาการแสดงออกของยีน *pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS)* และการสะสมโพรลีน พบว่า ต้นกล้ายางพารามีระดับการแสดงออกของยีน *P5CS* เพิ่มสูงขึ้นเมื่อยางพาราอยู่ในสภาวะขาดน้ำ โดยการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีน *P5CS* เกิดขึ้นในยางพาราพันธุ์ PB 5/51 เร็วกว่าพันธุ์ RRIT 408 และ RRIM 623 แต่ลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากขาดน้ำเป็นเวลา 5 วัน ในขณะที่ปริมาณการสะสมโพรลีน เริ่มเพิ่มขึ้นหลังจากวันที่ 5 ของการงดน้ำ ส่วนยางพาราพันธุ์ RRIM 623 และ RRIT 408 มีการแสดงออกของยีน *P5CS* เพิ่มขึ้นหลังจากมีการงดน้ำ 7 วัน สอดคล้องกับการสะสมโพรลีน โดยมีการแสดงออกของยีนสูงสุดหลังจากงดน้ำเป็นเวลา 9 วัน การศึกษาครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *P5CS* กับการสะสมโพรลีน อาจเนื่องจากกลไกการสะสมโพรลีนในยางพาราแต่ละพันธุ์มีความแตกต่างกัน อาจมีเอนไซม์หลักอื่นๆ เช่น *pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR)* เข้ามาเกี่ยวข้อง

<b>Thesis Title</b>	Physiological Responses and <i>P5CS</i> Gene Expression Involved in Proline Accumulation during Water Deficit Condition in Rubber Tree Seedling
<b>Author</b>	Miss Orawan Kaewraksa
<b>Major Program</b>	Plant Science
<b>Academic Year</b>	2018

### Abstract

In rubber plantation, seedling stage requires sufficient water for growth. Lack of water can cause serious damage. Therefore, using drought tolerant varieties can minimize the loss of rubber seedlings. Insufficient water intake will result in disruption of growth as well as physiological and chemical changes. In this study, changes in relative water content in the leaves, electrolyte leakage, maximum quantum efficiency of photosystem II ( $F_v/F_m$ ) and relative chlorophyll content of PB 5/51, RRIT 408, RRIM 623, RRIM 600, BPM 24 and RRIT 251 were studied at different time points of water deficit conditions (0, 1, 3, 5, 7, 9 and 11 days after water withholding). During water deficit, relative water content, maximum quantum efficiency of photosystem II ( $F_v/F_m$ ) and relative chlorophyll content were decreased. On the contrary, the electrolyte leakage was increased. Genotypic variation was observed among different rubber clones. Based on those results, rubber clones were divided into two groups: drought tolerance group includes RRIM 623, RRIT 408, RRIM 600 and RRIT 251 and susceptible group includes PB 5/51 and BPM 24. Subsequently, RRIM 623, RRIT 408 and PB 5/51 were chosen as representative of drought tolerant (RRIM 623 and RRIT 408) and drought sensitive (PB 5/51) clones for investigation of proline accumulation and expression of *pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS)* gene. PB 5/51 expressed the highest amount of *P5CS* gene at 5 days after water withholding but the expression was reduced quickly afterward. On the contrary, proline accumulation of PB 5/51 was gradually increased starting from 7 days after water withholding. Whereas enhanced expression of *P5CS* in RRIM 623 and RRIT 408 was detected at 7 days after water withholding and reached maximum level at 9 days after water withholding. Proline accumulation, however, continued to increase. Therefore, no

correlation between *P5CS* expression and proline accumulation in rubber seedling under drought was observed. This might due to different strategies of proline accumulation were implemented in different rubber genotypes. Other key enzymes might involve in this phenomena such as P5CR. However, drought sensitive (PB 5/51) and drought tolerant (RRIM 623 and RRIT 408) showed different *P5CS* expression patterns.



## กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ ดร.เสาวภา ดั่งปาน อาจารย์ที่ปรึกษาหลักในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นอย่างสูง ที่ให้คำแนะนำ ชี้แนวทางในการทำงาน ให้ความช่วยเหลือตลอดการทำงานวิจัย และตรวจทานแก้ไขเล่มรายงานวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ รองศาสตราจารย์ ดร.จรัสศรี นวลศรี ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กรกช นาคคอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำแนะนำ อบรมสั่งสอน และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ระวี เจียรวิภา กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำในการทำงานวิจัยและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ และดร.ธัญญ์วณิช ธัญสิริวรรณ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ให้เกียรติมาเป็นประธานกรรมการสอบ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณการสนับสนุนจากหน่วยงานต่างๆ โดยวิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ สถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และทุนอุดหนุนวิจัยเพื่อการทำวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ขอขอบคุณครอบครัว เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษามาโดยตลอดจนสำเร็จการศึกษา

อรวรรณ แก้วรักษา

## สารบัญ

	หน้า
รายการตาราง	(10)
รายการภาพ	(11)
รายการตารางภาคผนวก	(14)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	12
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	13
วัสดุ อุปกรณ์การวิจัย	13
วิธีการ	16
3. ผล	26
4. วิจัย	42
5. สรุป	47
เอกสารอ้างอิง	48
ภาคผนวก	53
ประวัติผู้เขียน	60

## รายการตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 สารออสโมไลต์ที่สำคัญที่มีการสะสมในพืชเมื่อพืชอยู่ภายใต้สภาวะเครียดแล้ง และสภาวะเครียดเกลือ	9
ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทป์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลนยีน <i>P5CS</i>	21
ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทป์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>P5CS</i> ของยางพารา	24

## รายการภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ลักษณะทั่วไปของยางพารา (A) ลำต้น (B) ใบ (C) ช่อดอก (D) เมล็ด	3
ภาพที่ 2 การปรับค่าแรงดันออกซิโมติกกับการสะสมโพสลิโนในเซลล์ (A) ลักษณะเซลล์ภายใต้สภาวะปกติ (B) ลักษณะเซลล์ภายใต้สภาวะเครียด	9
ภาพที่ 3 กระบวนการสังเคราะห์โพสลิโน	11
ภาพที่ 4 ระดับการประเมินลักษณะอาการที่ปรากฏของยางพาราหลังขาดน้ำ (1: ต้นยางพาราเป็นปกติ 2: ใบเริ่มแสดงอาการเหี่ยว 3: ใบแสดงอาการเหี่ยวชัดเจน มุมใบเริ่มเปลี่ยนเล็กน้อย 4: ใบ และก้านใบเหี่ยว เริ่มพบการเหี่ยวของปลายยอด และมุมใบเปลี่ยน 5: ใบ ก้านใบ และปลายยอดเหี่ยว มุมใบเริ่มเปลี่ยน)	17
ภาพที่ 5 แผนภาพโครงสร้าง TA พลาสมีด	22
ภาพที่ 6 อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ภายในโรงเรือน ตั้งแต่วันที่งดน้ำ 0 - 11 วัน	26
ภาพที่ 7 ปริมาณความชื้นดินในภาชนะปลูกยางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน	27
ภาพที่ 8 ระดับอาการเหี่ยวของยางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P \leq 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD	28
ภาพที่ 9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของยางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน (A: PB 5/51 B: RRIT 408 C: RRIM 623 D: RRIM 600 E: BPM 24 F: RRIT 251)	29
ภาพที่ 10 ปริมาณน้ำในพีชของยางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P \leq 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD	30
ภาพที่ 11 การร่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ของยางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P \leq 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD	31

### รายการภาพ (ต่อ)

	หน้า
<p><b>ภาพที่ 12</b> ค่าประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงของคลอโรฟิลล์ของยางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (<math>P \leq 0.05</math>) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD</p>	32
<p><b>ภาพที่ 13</b> ปริมาณคลอโรฟิลล์สัมพัทธ์ของยางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (<math>P \leq 0.05</math>) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD</p>	33
<p><b>ภาพที่ 14</b> ลักษณะแถบดีเอ็นเอของยางพาราที่ได้จากการทำพีซีอาร์ส่วนกลางของยีนด้วยไพรเมอร์ Forward: P52-F กับ Reward: P52-R (A) และ Forward: P53-F กับ Reward: P53-R (B) ส่วนปลาย 3' ด้วยไพรเมอร์ Forward: P57-F2 กับ universal primer B25 และ B26 (C) และ ส่วนปลาย 5' ด้วยไพรเมอร์ Forward: P5-F3 กับ Reward: P58-R2 (D) โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน DNA Ladder (M)</p>	34
<p><b>ภาพที่ 15</b> ลำดับนิวคลีโอไทป์และกรดอะมิโนของยีน <i>P5CS</i> ของยางพารา</p>	36
<p><b>ภาพที่ 16</b> AA_kinase (Amino acid kinase family) และ ALDH_F18-19_ProA-GPR (Gamma-glutamyl phosphate reductase (GPR), aldehyde dehydrogenase families 18 and 19) ตำแหน่งหลักที่เกิดการสังเคราะห์โปรตีนของยีน <i>P5CS</i></p>	37
<p><b>ภาพที่ 17</b> การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนโปรตีน <i>P5CS</i> ของยางพารากับ <i>EeP5CS</i> (<i>Eurya emarginata</i>: KR363007.1), <i>PpP5CS</i> (<i>Prunus persica</i>: KP973956.1), <i>MeP5CS</i> (<i>Manihot esculenta</i>: JQ807809.1) และ <i>JcP5CS</i> (<i>Jatropha curcas</i>: GU358610.1) จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม GeneDoc</p>	37
<p><b>ภาพที่ 18</b> Phylogenetic tree ของยีน <i>P5CS</i> ในยางพาราและพืชอื่นๆ 19 ชนิด จาก GeneBank โดยมีเลข Accession numbers ดังนี้ <i>Manihot esculenta</i>: <i>MeP5CS</i> (JQ807809.1) <i>Jatropha curcas</i>: <i>JcP5CS</i> (GU358610.1) <i>Boehmeria nivea</i>: <i>BnP5CS</i> (JN852975.1) <i>Prunus persica</i>: <i>PpP5CS</i> (KP973956.1) <i>Cucumis melo</i>: <i>CmP5CS</i> (JN590050.1) <i>Glycine max</i>: <i>GmP5CS</i>(AY492005.1) <i>Phaseolus vulgaris</i>: <i>PvP5CS</i> (EU340347.1) <i>Aegiceras corniculatum</i>: <i>AcP5CS</i> (DQ431113.1) <i>Eurya emarginata</i>: <i>EeP5CS</i> (KR363007.1) <i>Calotropis procera</i>: <i>CpP5CS</i> (KJ020750.1) <i>Nicotiana tabacum</i>:</p>	38

## รายการภาพ (ต่อ)

หน้า

*NtP5CS* (HM854026.1) *Lycium chinense*: *LcP5CS* (KF771023.1) *Solanum lycopersicum*: *SlP5CS* (U60267.1) *Solanum torvum*: *StP5CS* (JN606861.1) *Eucalyptus camaldulensis*: *EcP5CS* (EU254744.3) *Lilium hybrid* division VII cultivar Sorbonne: *LhP5CS* (KU057356.1) *Musa acuminata* AAA Group: *MaAAAP5CS* (JN387126.1) *Oryza sativa* (japonica cultivar-group): *OsP5CS* (AY574031.1) *Triticum aestivum*: *TaP5CS* (KM523670.1) *Saccharum officinarum*: *SoP5CS* (EU005373.2) and *Sorghum bicolor*: *SbP5CS* (GQ377720.2)

- ภาพที่ 19** ระดับการแสดงออกของยีน *P5CS* ของยางพาราพันธุ์ PB 5/51, RRIT 408 และ RRIM 623 ภายใต้สภาวะขาดน้ำเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P \leq 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD 40
- ภาพที่ 20** ปริมาณโปรตีนของยางพาราพันธุ์ PB 5/51, RRIT 408 และ RRIM 623 ภายใต้สภาวะขาดน้ำเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P \leq 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD 41

**รายการตารางภาคผนวก**

	<b>หน้า</b>
ตารางภาคผนวกที่ 1 ชื่อพันธุ์ และสถานที่เก็บเมล็ดพันธุ์ยางพาราที่ใช้ในการทดลอง	55
ตารางภาคผนวกที่ 2 ระดับการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยาของยางพาราที่ 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน หลังงดการให้น้ำ	56
ตารางภาคผนวกที่ 3 ปริมาณน้ำในใบของยางพาราที่ 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน หลังงดการให้น้ำ	56
ตารางภาคผนวกที่ 4 การร่วงไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ ของยางพาราที่ 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน หลังงดการให้น้ำ	57
ตารางภาคผนวกที่ 5 ประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงของคลอโรฟิลล์ของยางพาราที่ 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน หลังงดการให้น้ำ	57
ตารางภาคผนวกที่ 6 ปริมาณคลอโรฟิลล์สัมพัทธ์ของยางพาราที่ 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน หลังงดการให้น้ำ	58
ตารางภาคผนวกที่ 7 ระดับการแสดงออกของยีน <i>P5CS</i> ของยางพาราที่ 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน หลังงดการให้น้ำ	58
ตารางภาคผนวกที่ 8 ปริมาณโปรตีนของยางพาราที่ 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน หลังงดการให้น้ำ	59

## บทที่ 1

### บทนำ

#### บทนำต้นเรื่อง

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) เป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของไทย และภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทยพื้นที่ปลูกยางพาราส่วนใหญ่อยู่ทางภาคใต้ โดยมีพื้นที่ปลูก 11.9 ล้านไร่ หรือประมาณ 63% ของพื้นที่ปลูกยางพาราในประเทศ (สายัณห์ และอัศมน, 2558) สถานการณ์การผลิตยางพารา ในปี 2561 พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของพื้นที่ยางพาราที่กรี๊ดได้ เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของพื้นที่ปลูกยางพาราในปี 2555 จากการเพิ่มขึ้นของราคายาง ส่งผลให้เกษตรกรขยายพื้นที่ปลูกแทนพืชไร่ ไม้ผล พื้นที่นา และโค่นยางพาราในพื้นที่ที่มีอายุมากแล้วทำการปลูกใหม่ (คณะกรรมการพัฒนาคุณภาพข้อมูลด้านการเกษตร, 2561) ทั้งนี้การปลูกสร้างสวนยางประสบกับปัญหาต่างๆ มากมาย ได้แก่ การระบาดของโรค การปลูกยางในพื้นที่ที่ไม่เหมาะสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัญหาความแห้งแล้ง โดยในปี 2558 นั้นถือว่ามีความรุนแรงมากที่สุดในรอบหลายๆ ปีที่ผ่านมา ประกอบกับผลจากปรากฏการณ์เอลนีโญ ส่งผลให้ฝนไม่ตกตรงตามฤดูกาล หรือมีปริมาณน้ำฝนที่น้อยกว่าระดับปกติ ทำให้การกักเก็บน้ำของแหล่งน้ำขนาดใหญ่ๆ สามารถกักเก็บได้ในปริมาณน้อย นำไปสู่ความเสียหายภาคเศรษฐกิจ และสังคม ทั้งด้านการขาดแคลนน้ำเพื่อการอุปโภคบริโภค และด้านการเพาะปลูกของภาคการเกษตร (ศูนย์พยากรณ์เศรษฐกิจและธุรกิจ, 2558)

ปัญหาความแห้งแล้งจะส่งผลกระทบต่อ การปลูกสร้างสวนยางพารา โดยในระยะ ต้นกล้า ปริมาณน้ำที่ไม่เพียงพอจะทำให้ต้นกล้ายางพาราได้รับความเสียหาย และตายเป็นจำนวนมาก ในช่วงที่ให้ผลผลิต ปริมาณน้ำที่ไม่เพียงพอจะทำให้ผลผลิตน้ำยางลดลง วิธีแก้ปัญหาคือบรรเทาความเสียหายที่เกิดจากสภาวะแห้งแล้งที่ดีที่สุด คือ การปลูกพันธุ์ยางทนแล้ง ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ยางพาราทนแล้งจึงมีความจำเป็นอย่างมาก เพื่อให้ได้พันธุ์ยางที่สามารถเจริญเติบโต และให้ผลผลิตน้ำยาง หรือสามารถอยู่รอดได้ในสภาวะแห้งแล้งที่ยาวนาน การเปลี่ยนแปลงทางด้าน สรีรวิทยาของยางพาราซึ่งเกิดขึ้นจากขาดน้ำส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืช ปัจจุบันมีการคิดค้นวิธี และประดิษฐ์เครื่องมือต่างๆ ให้สามารถตรวจสอบการตอบสนองด้านสรีรวิทยาของพืช ซึ่งสามารถนำข้อมูลทางสรีรวิทยาไปใช้ในการคัดเลือก และปรับปรุงพันธุ์ยางพาราได้ นอกจากนี้ในการปรับปรุงพันธุ์ยางพาราซึ่งเป็นไม้ยืนต้นได้มีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้เพื่อลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ เช่น การคัดเลือกพันธุ์ยางที่มีลักษณะที่ต้องการในระยะต้นกล้าโดยใช้

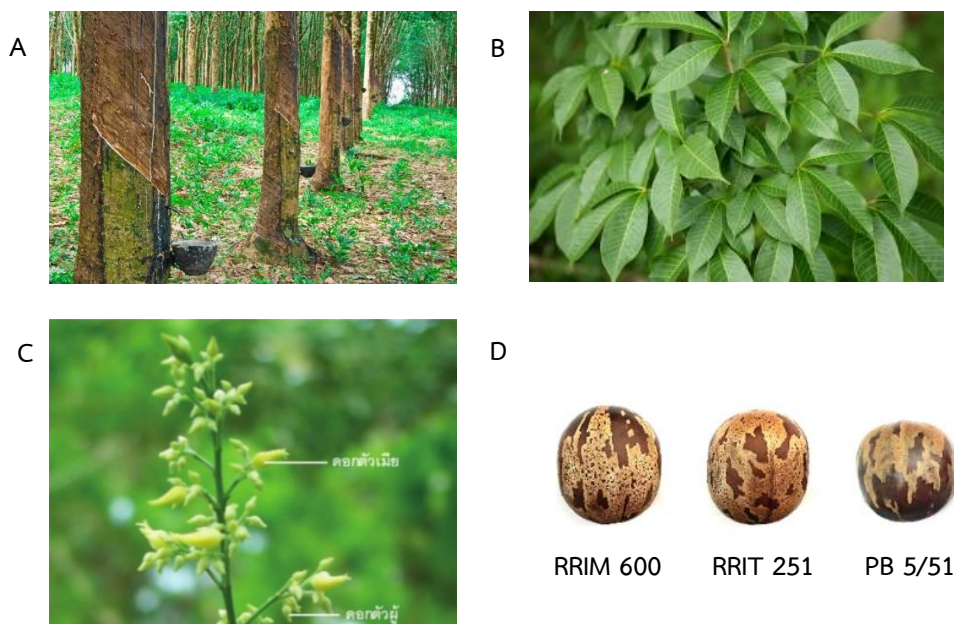


เครื่องหมายโมเลกุล เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อคัดเลือกพันธุ์จากการแสดงออกของยีนที่ควบคุมลักษณะที่สนใจ ในกรณีนี้สามารถทำได้เมื่อทราบวาระดับการแสดงออกของยีนนั้นสัมพันธ์กับลักษณะหรือฟีโนไทป์ที่ต้องการ ยีน pyrroline-5-carboxylate synthetase (*P5CS*) เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างโพรลีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่งที่พืชสร้างขึ้นเพื่อช่วยปรับค่าแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ในเซลล์เมื่อพืชอยู่ในสภาวะขาดน้ำ การที่พืชสะสมปริมาณโพรลีนเพิ่มขึ้นเพื่อเป็นแหล่งของสารละลายสำหรับช่วงการปรับสภาพแรงดันออสโมติกในเซลล์ และช่วยรักษาการทำงานของเอนไซม์ให้ดำเนินไปเป็นปกติ (Boggess *et al.*, 1976) เป็นการส่งเสริมให้พืชสามารถอยู่รอดในสภาวะแห้งแล้งได้ การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงทางด้านสัณฐานวิทยา การตอบสนองทางสรีรวิทยา เพื่อคัดเลือกยางพาราที่มีแนวโน้มทนทานต่อสภาวะขาดน้ำ และศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* กับการสะสมโพรลีนในยางพาราภายใต้สภาวะขาดน้ำ หากพบว่า การแสดงออกของยีน *P5CS* สอดคล้องกับการสะสมโพรลีน และการทนแล้งของยางพารา ก็สามารถนำมาใช้เป็นยีนเป้าหมายในการคัดเลือกพันธุ์ยางเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ยางพาราทนแล้งต่อไป

## การตรวจเอกสาร

### 1. ลักษณะทั่วไปของยางพารา

ยางพารา (rubber tree) อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae ชื่อวิทยาศาสตร์ *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. เป็นพืชให้น้ำยาง มีถิ่นกำเนิดจากทวีปอเมริกาใต้ เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ มีระบบรากแก้ว ลำต้นตั้งตรง เป็นไม้เนื้ออ่อน ใบเป็นใบประกอบ (compound leaf) แบบ palmate มีใบย่อย 3 ใบ การเรียงตัวของใบเป็นแบบเกลียว (spiral) ใบที่เกิดใหม่แต่ละรอบแบ่งเป็นชั้นๆ หรือเรียกว่า ฉัตร ดอกยางพารามีลักษณะเป็นช่อ compound raceme หรือ panicle โดยดอกตัวเมียมีขนาดใหญ่อยู่ปลายสุดของช่อ และดอกตัวผู้มีขนาดเล็กอยู่ต่ำกว่าดอกตัวเมีย ซึ่งดอกตัวเมียและดอกตัวผู้อยู่บนช่อเดียวกัน ผสมพันธุ์แบบเปิด ผลยางพารามีลักษณะเป็นพู่ 3 พู่ แต่ละพู่มี 1 เมล็ดบรรจุอยู่ภายใน เมล็ดมีรูปร่างและสีขึ้นอยู่กับแต่ละพันธุ์ (ภาพที่ 1) ยางพาราถูกนำเข้ามาปลูกเป็นครั้งแรกที่อำเภอกันตัง จังหวัดตรัง การปลูกยางพารา และอาชีพสวนยางทำรายได้ที่แน่นอนยังยืนจึงได้รับความนิยม และแพร่หลายไปในทุกจังหวัดของภาคใต้ ปัจจุบันก็ได้แพร่หลายไปยังภาคตะวันออกและบางจังหวัดของภาคอีสาน โดยได้รับการส่งเสริมสนับสนุนจาก กองทุนสงเคราะห์การทำสวนยางองค์การสวนยาง และจากกรมวิชาการเกษตรในปี 2544 (ประวิตร, 2556)



ภาพที่ 1 ลักษณะทั่วไปของยางพารา ส่วนของลำต้น (A) ใบ (B) ช่อดอก (C) และเมล็ด (D)  
ที่มา : ศยามล (2558)

## 2. การขยายพันธุ์พืช

การขยายพันธุ์พืช (plant propagation) เป็นการเพิ่มจำนวนต้นพืชให้มากยิ่งขึ้นจากที่มีอยู่ แบ่งออกเป็นขยายพันธุ์โดยอาศัยเพศและการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศ โดยการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศหรือการใช้ส่วนต่างๆ เช่น ราก ลำต้น กิ่ง ใบ ตา ยอด และหน่อของพืช ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ ขจัดปัญหาพืชบางชนิดไม่มีเมล็ด ได้ต้นพืชที่มีลักษณะตรงตามพันธุ์ ได้ต้นที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนต้นแม่ทุกประการ ซึ่งวิธีนี้สามารถเลือกขนาดของต้นพันธุ์และกิ่งพันธุ์ที่ต้องการได้ ทำให้ต้นพืชที่ได้มีขนาดสม่ำเสมอ ต้นไม่สูง ง่ายต่อการดูแลรักษาและเก็บเกี่ยวผลผลิต นอกจากนี้พืชสามารถออกดอกติดผล และให้ผลผลิตเร็วกว่าต้นที่เพาะจากเมล็ด วิธีการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ได้แก่ การตัดชำ การตอนกิ่ง การต่อกิ่ง การทาบกิ่ง และการติดตา เป็นต้น (อุไรวรรณ, 2561) การขยายพันธุ์โดยการติดตาเป็นที่ยอมรับในการผลิตต้นกล้ายางพารา โดยมีการตรวจสอบแล้วว่า การเจริญเติบโตทางลำต้น และการให้ผลผลิตโดยส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับศักยภาพของกิ่งพันธุ์ดี หากต้นตอยางพารามีระบบรากสมบูรณ์แข็งแรง ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อการเจริญเติบโต และการให้ผลผลิตน้ำยางแห้งของกิ่งพันธุ์ดีที่ใช้ (Gireesh *et al.*, 2012) นอกจากนี้การขยายพันธุ์พืชแบบไม่อาศัยเพศบางวิธีมีข้อจำกัดเรื่องระบบรากที่ได้จากการขยายพันธุ์ โดยต้นพืชที่ได้จากการตัดชำ ตอนกิ่ง พืชจะไม่มีรากแก้วหรือรากที่ยังลึกลง

ดินทำหน้าที่ยึดต้นพืชไว้กับดิน ทำให้พืชโค่นล้มได้ง่ายเมื่อได้รับผลกระทบจาก แรงแลม ฝนกระหน่ำ หรือน้ำหนักลำต้นเหนือดินมาก ดังนั้น การขยายพันธุ์โดยการทาบกิ่ง เสียบยอด หรือติดตา สามารถลดข้อจำกัดนี้ได้ ซึ่งกระบวนการดังกล่าวต้องใช้ต้นตอเป็นหลัก นอกจากนี้การใช้ต้นตอยังสามารถลดความเสียหายของพืชปลูกได้ เนื่องจากพืชบางชนิดมีคุณสมบัติพิเศษ เช่น การทนทานต่อโรค และแมลง สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดี การใช้ต้นตอที่มีศักยภาพในการเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ช่วยลดความเสียหายของปริมาณ และคุณภาพผลผลิตพืช (อุไรวรรณ , 2561) เช่น Georgikon 28 เป็นพันธุ์อู่งุ่นที่นิยมนำมาใช้เป็นต้นตอซึ่งมีความสามารถในการทนแล้ง เมื่อเทียบกับพันธุ์ Teleki 5C และ Teleki - Fuhr SO4 พบว่า พันธุ์ Georgikon 28 สามารถให้ผลผลิตมากกว่าถึง 20% (Kocsis and Varga, 2009) หรือมีผลต่อยอดพันธุ์ดีในด้านการเจริญเติบโตตลอดจนการให้ผลผลิตที่มีคุณภาพ การใช้ต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีจากยารพาราพันธุ์ RRIM 600 และ GT 1 พบว่า การวิเคราะห์หีเมตาโบโลมิกส์ของต้นตอที่ต่างกัน ส่งผลให้น้ำยาที่ได้มีคุณสมบัติต่างกัน (Nascimento *et al.*, 2011)

การขยายพันธุ์ยางพาราจึงนิยมใช้วิธีการติดตา โดยนำชิ้นส่วนแผ่นตาจากกิ่งพันธุ์ดี มาวางบนแผลของต้นตอต้องวางให้บริเวณเนื้อเยื่อเจริญแนบกับต้นตอมากที่สุดภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมที่เซลล์ของพืชเจริญได้ดี อุณหภูมิที่เหมาะสมในการพัฒนาของตาบนต้นตออยู่ในช่วง 12.8-32.0 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ชิ้นส่วนพืชทั้งสองเกิดการสร้างกลุ่มเซลล์พาเรโนไคมา เกิดเป็นเนื้อเยื่อแคลลัส กระบวนการเกิดเนื้อเยื่อใหม่จะดำเนินไปเรื่อยๆ ตามแนวของเยื่อเจริญเดิม จนกระทั่งเนื้อเยื่อใหม่ของทั้งสองชิ้นส่วนชนกัน เกิดการทำหน้าที่เป็นเนื้อเยื่อทันที โดยเกิดท่อลำเลียงอาหารใหม่ ปัจจัยที่มีผลต่อการประสานกันของรอยต่อขึ้นอยู่กับความเข้ากันได้ระหว่างกิ่งพันธุ์ดี และต้นตอ การใช้ตายอดติดบนต้นตอของพืชชนิดเดียวกันได้ผลน้อยกว่าการติดตาบนต้นพืชชนิดอื่น (ชวนพิศ, 2554) สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมซึ่งทำให้การติดตาประสบความสำเร็จ ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น และออกซิเจน รวมทั้งเทคนิคในการขยายพันธุ์ของผู้ปฏิบัติ และการใช้สารเร่งการประสานของรอยต่อในกลุ่มไซโตไคนิน ต้นตอที่ดีต้องมีคุณสมบัติ ดังนี้ ต้นตออยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ แข็งแรง ปราศจากโรค และศัตรูพืช รากแก้วเหยียดตรง ไม่มีแผล ไม่คดงอ หรือบิดเบี้ยว ลำต้นตรง เส้นผ่าศูนย์กลางไม่น้อยกว่า 1 เซนติเมตรและไม่เกินกว่า 2.5 เซนติเมตร ความสูงจากโคนคอดินถึงตา ต้องไม่เกิน 8 เซนติเมตร ต้นตออย่างควรปลูกช่วงต้นฤดูฝน สามารถติดตาได้ดีเมื่อต้นกล้าที่ใช้เป็นต้นตอมีอายุ 6 - 8 เดือน หรือต้นที่ความสูงจากพื้นดิน 10 เซนติเมตรมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นไม่น้อยกว่า 1 เซนติเมตร หลังจากติดตา 21 วัน หากการติดตาสำเร็จให้ตัดยอดในระดับความสูง 10-15 เซนติเมตร เอียงทำมุม 45 องศา ลงไปทางด้านตรงกันข้ามกับแผ่นตา (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, 2559)

### 3. ความสำคัญของน้ำต่อพืช

น้ำมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต พืชล้มลุกมีน้ำเป็นองค์ประกอบ 80-95% ของน้ำหนักสดพืช ในพืชยืนต้นมีน้ำเป็นองค์ประกอบ 30-50% ของน้ำหนักสดพืช ปริมาณน้ำในพืชแตกต่างกันออกไปตามชนิด อายุ และเนื้อเยื่อของพืช (สมบุญ, 2544) น้ำเป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์พืช เซลล์แต่ละชนิดมีลักษณะแตกต่างกันออกไป ซึ่งน้ำเป็นตัวช่วยรักษาสภาพความเต่งของเซลล์ (cell turgidity) มีผลต่อการเปิดปิดปากใบ ช่วยรักษาสภาพโครงสร้างของโพรโทพลาซึม ส่งผลต่อการพัฒนาและการขยายขนาดของเซลล์พืช ก่อให้เกิดส่วนต่างๆ ของพืชที่สมบูรณ์ และน้ำเป็นองค์ประกอบของสารอินทรีย์ภายในเซลล์ หากในเซลล์มีปริมาณน้ำที่ไม่เพียงพอทำให้เกิดความผิดปกติของเซลล์ได้ อีกทั้งยังรักษาอุณหภูมิภายในเซลล์ให้คงที่ เนื่องจากน้ำมีความร้อนจำเพาะสูง (specific heat) การเปลี่ยนสถานะจากน้ำเป็นไอน้ำต้องใช้ปริมาณความร้อนสูง เมื่อพืชได้รับความร้อนจากภายนอก อุณหภูมิภายในพืชจึงเปลี่ยนแปลงไม่มาก

น้ำเป็นตัวช่วยในการลำเลียงธาตุอาหารจากภายนอกเข้าสู่พืช ส่วนใหญ่ธาตุอาหารที่พืชได้รับจะมาจากดิน น้ำมีสมบัติเป็นตัวทำละลายที่ดี ดังนั้นเมื่อดินมีความชื้นเพียงพอที่สามารถละลายแร่ธาตุที่มีอยู่ในดิน รากพืชก็สามารถดูดซับน้ำและแร่ธาตุที่อยู่ในรูปสารละลายขึ้นไป น้ำตาลที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช ถูกนำไปใช้โดยมีน้ำเป็นตัวทำละลายและเป็นตัวเคลื่อนย้ายไปยังส่วนต่างๆ ของพืช เพื่อใช้สร้างสารอื่นๆ ที่จำเป็นในการเจริญเติบโต นอกจากนี้น้ำยังมีบทบาทและส่วนร่วมในปฏิกิริยาซึ่งเกิดขึ้นในกระบวนการเมแทบอลิซึมทั้งโดยตรงและโดยอ้อมในการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางกายภาพของพืช เช่น ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการแตกตัวของสารโดยมีน้ำเป็นตัวร่วมปฏิกิริยาด้วย (ชวนพิศ, 2544)

### 4. สภาวะเครียดน้ำของพืช

สภาวะเครียดของพืชเกิดจากปัจจัยภายนอกที่ไม่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของพืช โดยสามารถแบ่งปัจจัยที่ก่อให้เกิดสภาวะเครียดเป็น 2 ประเภท คือ ความเครียดที่เกิดจากสิ่งไม่มีชีวิต (abiotic stress) ได้แก่ ความเครียดที่เกิดจากการขาดน้ำ น้ำท่วม ดินเค็ม ความเข้มแสงมาก อุณหภูมิอากาศสูงหรือต่ำกว่าปกติ สารเคมีกำจัดวัชพืช โลหะหนัก ส่วนความเครียดจากสิ่งมีชีวิต (biotic stress) ได้แก่ การเข้าทำลายของเชื้อโรคพืช แมลง เป็นต้น (อินทิรา, 2560) โดยสภาวะขาดน้ำเกิดขึ้นเนื่องจากพืชมีอัตราการคายน้ำมากกว่าการดูดซับน้ำไปใช้ สภาวะเครียดน้ำหรือสภาวะเครียดแล้งเกี่ยวข้องกับอย่างมากกับความชื้นในดิน โดยคุณสมบัติการเก็บน้ำในดิน (soil water retention) ขึ้นอยู่กับลักษณะของเนื้อดิน และสารอินทรีย์หรือฮิวมัสในดิน ช่องว่างในดินที่มีขนาด

ใหญ่จะปล่อยให้ น้ำ ระบายออกจากดินได้ง่าย ในทางตรงกันข้ามช่องว่างดินขนาดเล็กจะมีแรงดูดซึมน้ำได้สูงกว่า ความชื้นในดินที่พืชสามารถนำไปใช้ได้คิดจากผลต่างระหว่างค่าความชื้นชลประทาน (field capacity) กับค่าความชื้นที่จุดเหี่ยวเฉา (permanent wilting point) โดยค่าความชื้นชลประทาน คือ น้ำที่ดินสามารถดูดซับไว้ได้หลังจากที่น้ำอิสระ (free water) ระบายออกหมด ในระยะนี้ความชื้นในดินจะมีการเปลี่ยนแปลงน้อย เหลืออยู่เฉพาะปริมาณน้ำที่ดินสามารถดูดซับไว้ได้เต็มที่ (capillary water) ส่วนความชื้นที่จุดเหี่ยวเฉาถาวร คือ ความชื้นในดินที่ต้นพืชไม่สามารถดูดซับมาใช้ได้ และหลังจากนั้นพืชจะเริ่มมีการเหี่ยวเฉาอย่างถาวร (ส่วนการใช้ น้ำ ชลประทาน สำนักกอกุทวิทยาและบริหารน้ำ, 2554) สภาวะขาดน้ำหรือสภาวะแล้ง เป็นช่วงที่มีสภาพภูมิอากาศแห้งแล้งเป็นเวลานาน อาจมีสาเหตุมาจากการขาดน้ำฝนหรือปัจจัยอื่นที่ทำให้ น้ำ ไม่เพียงพอ พืชและสัตว์ต้องการน้ำเพื่อการดำรงชีพ สภาวะขาดน้ำจึงสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต สภาวะเครียดจากการขาดน้ำเป็นสภาวะที่เกิดขึ้นทั่วไปเกือบ 25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่เกษตร (Fathi and Tari, 2016)

ความเสียหายจากสภาวะขาดน้ำมีอิทธิพลรวมกันของปัจจัยทางชีวภาพ และสิ่งแวดล้อม สภาวะขาดน้ำเป็นปัจจัยที่จำกัดการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของพืชปลูก ทำให้พืชเกิดกระบวนการเจริญเติบโตที่ผิดปกติหรือต่างไปจากเดิม ทั้งกระบวนการทางสรีรวิทยา มีการเปลี่ยนแปลงของการไหลเวียนน้ำในพืช การสังเคราะห์แสง และกระบวนการทางชีวโมเลกุล เกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระที่มีผลต่อโครงสร้างและสมบัติของเซลล์พืช เมทาบอลิซึมต่างๆ ภายในเซลล์เปลี่ยนแปลงไป ก่อให้เกิดการทำงานที่ผิดปกติ ซึ่งส่งผลให้การเจริญเติบโตลดลงหรือหยุดชะงัก ผลผลิตพืชลดลง และอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพของพืชได้ (อินทรา, 2560)

## 5. การตอบสนองของพืชภายใต้สภาวะขาดน้ำ

ความร้อนหรืออุณหภูมิอากาศสูง ทำให้การคายน้ำในพืช และการระเหยน้ำในดินเพิ่มสูงขึ้น ก่อให้เกิดความเครียดแล้ง แต่พืชยังพยายามรับแสงและสังเคราะห์แสง ส่งผลให้พืชมีการสูญเสียน้ำมากกว่าการดูดน้ำ เกิดเป็นความเครียดต่อสภาวะขาดน้ำ (เอ็จ, 2554) สภาวะแล้งมีผลต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาและชีวโมเลกุลของพืช เช่น การสังเคราะห์แสงลดลง การปิดปากใบ การเกิดสารประกอบออกซิเจนที่ไวต่อปฏิกิริยา (reactive oxygen species) ซึ่งจะทำลายองค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ เช่น โปรตีน และดีเอ็นเอ สร้างความเสียหายให้กับพืช (Osakabe *et al.*, 2014) พืชตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำด้วยกระบวนการต่างๆ หลายกระบวนการทั้งด้านสรีรวิทยา และชีวโมเลกุล

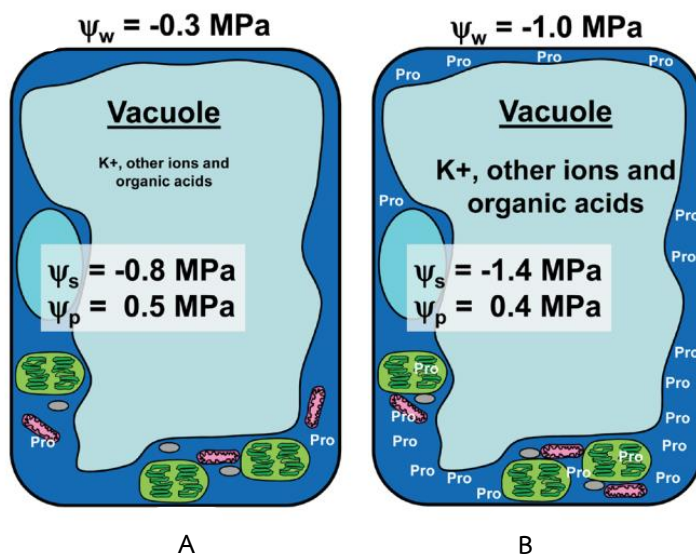
## 5.1 การตอบสนองทางสรีรวิทยาของพืช

เมื่อพืชอยู่ในสภาวะขาดน้ำมีกระบวนการตอบสนองทางสรีรวิทยาเกิดขึ้นอย่างมาก โดยปริมาณน้ำในใบ (relative water content) เป็นตัวบ่งชี้ที่สามารถตรวจสอบได้อย่างชัดเจน เมื่อพืชขาดน้ำ เป็นการเปรียบเทียบปริมาณน้ำในช่วงเวลาหนึ่งกับใบที่อืดตัวด้วยน้ำ และใบที่ถูกดึงน้ำออก ซึ่งสอดคล้องและสัมพันธ์กับการวัดศักย์ของน้ำในใบพืช (เฉลิมพล, 2535) การเกิดความเครียดแล้งอย่างรุนแรง ทำให้พืชมีการปรับแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ซึ่งเป็นกลไกที่พืชพยายามควบคุมศักย์ของน้ำ (water potential) ในส่วนต่างๆ ของลำต้นให้อยู่ในสมดุล จะทำให้อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสง และการหายใจของพืชลดลง อาการเหี่ยวและร่วงของใบเป็นการปรับตัวเพื่อการอยู่รอดของต้นพืช ซึ่งถือว่าเป็นกระบวนการที่มีการตอบสนองไวที่สุด การขาดน้ำส่งผลต่อการผลิตอาหารของพืช การเปิดปิดปากใบลดลงทำให้ช่องทางที่พืชรับคาร์บอนไดออกไซด์มาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงลดลง และยังเกี่ยวกับการดูดซึมน้ำและธาตุอาหารมาใช้ (สายพันธ์, 2537) สภาวะขาดน้ำก่อให้เกิดความเสียหายถึงระดับเซลล์พืช เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายสารอิเล็กโทรไลต์ต่างๆ ภายในเซลล์เกิดการรั่วไหลออกมาภายนอกเซลล์ สามารถวัดค่าการนำไฟฟ้าในสารละลายที่มีขึ้นส่วนพืชได้ ค่าการนำไฟฟ้าในสารละลายของพืชที่ได้รับความเสียหายจะสูงกว่าพืชที่อยู่ในสภาวะปกติ กล่าวคือ การรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ของขึ้นส่วนใบพืชเพิ่มขึ้นตามระดับความรุนแรงของสภาวะขาดน้ำที่พืชได้รับ (คงเอก, 2558) นอกจากนี้ความเสียหายของเซลล์ที่เกิดขึ้นส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชด้วย โดยทั่วไปเมื่อพลังงานแสงส่องกระทบใบพืชจะเกิดการดูดกลืนพลังงานแสงเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยพลังงานที่ได้รับมีการส่งผ่านอิเล็กตรอน ไปยังศูนย์กลางของปฏิกิริยาการสังเคราะห์แสง จาก Photosystem II ไปยัง photosystem I แต่มีพลังงานแสงส่วนหนึ่งที่ไม่ได้ใช้ในปฏิกิริยานี้ จึงเกิดการขจัดออกในรูปของคลื่นความร้อน หรือเปลี่ยนเป็นแสงฟลูออเรสเซนซ์ การวัดรังสีฟลูออเรสเซนซ์จึงเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ประเมินประสิทธิภาพของการสังเคราะห์แสงได้ ในสภาวะปกติเมื่อใบพืชได้รับความมืดช่วงเวลาหนึ่ง ตัวรับอิเล็กตรอนใน photosystem II จะอยู่ในสภาพ ground state สามารถเปิดรับพลังงานแสงได้สูงสุดเมื่อได้รับแสง และคลอโรฟิลล์ฟลูออเรสเซนซ์ก็จะถูกเปล่งออกมาต่ำสุด ( $F_0$ , minimum fluorescence) ทันทีที่ได้รับแสงตัวรับอิเล็กตรอนจะเปลี่ยนไปอยู่ในสภาพ excite state การเปล่งฟลูออเรสเซนซ์ของคลอโรฟิลล์ก็จะเพิ่มสูงสุด ( $F_m$ , maximum fluorescence) เมื่อพลังงานถูกส่งต่อไปยัง photosystem I การเปล่งฟลูออเรสเซนซ์ของคลอโรฟิลล์ก็จะลดลงสู่ระดับต่ำสุดอีกครั้ง ตัวรับอิเล็กตรอนก็จะสามารถรับพลังงานแสงได้อีกครั้ง ความต่างระหว่างค่า  $F_m$  และ  $F_0$  เรียกว่า variable fluorescence ( $F_v$ ) คือ ความสามารถของ photosystem II ในการรับพลังงานแสงแล้วถ่ายทอดไปสู่ photosystem I มีสูตรดังนี้  $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$  (นวลมณี, 2553) การลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์

เมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียดแล้ง ซึ่งให้เห็นความสามารถในการนำแสงมาใช้ในต้นพืชลดลง เนื่องจากมีการสร้าง reactive oxygen species เกิดขึ้นโดยพลังงานแสงส่วนเกินในกลไกการสังเคราะห์แสง เป็นการหลีกเลี่ยงการเสื่อมสลายของรงควัตถุที่ทำหน้าที่ดูดกลืนแสง (Mafakheri *et al.*, 2010) การตอบสนองของพืชต่อสภาวะขาดน้ำที่เกิดขึ้นเห็นได้จาก ต้นยาสูบที่ได้รับสภาวะเครียดแล้ง พบว่า น้ำในดินลดลง 10% ทุกๆ 2 วัน ต้นยาสูบมีการตอบสนองต่อสภาวะเครียดแล้งสูงสุดเมื่องดการให้น้ำเป็นเวลา 28 วันหรือมีค่า field capacity เป็น 15% พบค่า RWC ที่เพิ่มสูงขึ้น การสังเคราะห์ด้วยแสง (net photosynthesis) ลดลงเมื่อเกิดความเครียดแล้งที่รุนแรง ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ค่าการชักนำ การเปิดปิดปากใบลดลงด้วย (Sapeta *et al.*, 2013) ในบางพารา พบว่า ศักย์ของน้ำในใบในช่วงฤดูร้อนมีค่าลดลงมากกว่าฤดูฝนอย่างเห็นได้ชัด และพบว่า ค่าการชักนำการเปิดปิดปากใบลดลงเช่นกัน เป็นผลมาจากการขาดน้ำ ศักย์ของน้ำในใบถูกควบคุมโดยการชักนำการเปิดปิดปากใบ การที่ปากใบ ปิดเป็นการลดการคายน้ำจากใบพืชเพื่อรักษาศักย์ของน้ำในใบ (Kunjet *et al.*, 2013)

## 5.2 การตอบสนองทางชีวเคมีของพืช

ภายใต้สภาวะขาดน้ำ เซลล์พืชเกิดการตอบสนองได้อย่างรวดเร็ว เพราะน้ำเป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์ ในขณะที่ศักย์ออสโมติก (osmotic potential) ภายในเซลล์สูงกว่าภายนอกแต่ไม่มีน้ำเพียงพอที่จะเข้าไปยังเซลล์ได้จึงเกิดการปรับค่าศักย์ออสโมติก (osmotic adjustment) ภายในเซลล์ให้ต่ำลง เพื่อรักษาค่าแรงดันออสโมติกในต้นพืช (ภาพที่ 2) โดยการสะสมตัวถูกละลายที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์หรือสารออสโมไลต์ (compatible solute) ได้แก่ ซูโครส ซอร์บิทอล แมนนิทอล บีเทน และโพรลีน เป็นต้น (ตารางที่ 1) สารประกอบเหล่านี้นอกจากทำหน้าที่ปรับค่าศักย์ออสโมติกแล้ว ยังทำหน้าที่ป้องกันโปรตีนที่เป็นพิษต่อเซลล์ (osmoprotectant) พืชเกิดการตอบสนองโดยการสร้างเอนไซม์ที่กำจัดสารอนุมูลอิสระ ได้แก่ superoxide dismutase ascorbate และ peroxidase (Karpinski *et al.*, 1997) ช่วยกำจัดสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นเมื่อพืชขาดน้ำ ซึ่งเป็นอันตรายต่อกระบวนการเมทาบอลิซึมและเซลล์พืช กระบวนการตอบสนอง และการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลหรือเมทาบอลิซึมต่างๆ เกิดจากการแสดงออกของยีนเป็นการเปลี่ยนแปลงระดับยีน (เอ็จ, 2554)



ภาพที่ 2 การปรับค่าแรงดันออสโมติกกับการสะสมโพรลีนในเซลล์ภายใต้สภาวะปกติ (A) และภายใต้สภาวะเครียด (B) ( $\Psi_w$ ; ศักย์ของน้ำ  $\Psi_s$ ; ศักย์ออสโมติก  $\Psi_p$ ; แรงดันออสโมติก)

ที่มา : Verslues และ Sharma (2010)

ตารางที่ 1 สารออสโมไลต์ที่สำคัญที่มีการสะสมในพืชเมื่อพืชอยู่ภายใต้สภาวะเครียดแล้งและสภาวะเครียดเกลือ

Carbohydrate	Nitrogenous compound	Organic acid
Sucrose	Proteins	Oxalate
Sorbitol	Betaine	Malate
Mannitol	Glutamate	
Glycerol	Aspartate	
Arabinitol	Glycine	
Pinitol	Proline	
Other polyols	Putrescine	

ที่มา: Sairam และ Tyagi (2004)



## 6. การสะสมโพรลีนในพืช

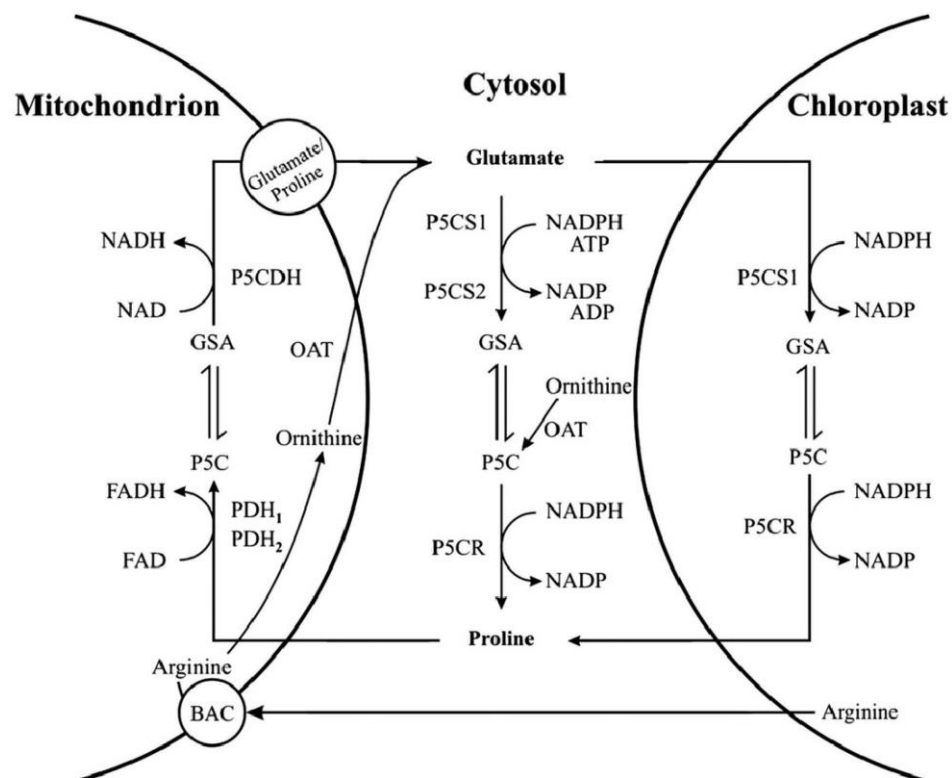
โพรลีน คือ กรดอะมิโนชนิดหนึ่งที่มีพบว่าการสะสมภายในเซลล์เพื่อตอบสนองต่อสภาวะเครียดต่างๆ เช่น ความเครียดเกลือ ความเครียดจากอุณหภูมิสูง ความเครียดแล้ง เป็นต้น โดยพบในสิ่งมีชีวิตทั้งแบคทีเรียและพืชชั้นสูง ในกรณีของความเครียดที่เกิดจากสภาวะขาดน้ำของพืช การสร้างหรือการสะสมโพรลีนเป็นส่วนช่วยในการปรับค่าแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ การเพิ่มขึ้นของโพรลีนภายในเซลล์ทำให้พืชสามารถที่จะอยู่รอดได้ในสภาวะขาดน้ำและความเข้มข้นเกลือสูง การที่พืชสะสมปริมาณโพรลีนเพิ่มขึ้นเพื่อเป็นแหล่งของสารละลายสำหรับช่วยในการปรับสภาพออสโมติกในเซลล์ สามารถเป็นสารอินทรีย์ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน และคาร์บอนสำรองที่พืชสามารถนำมาใช้ได้ระหว่างการฟื้นตัวจากสภาวะขาดน้ำ และช่วยรักษาการทำงานของเอนไซม์ให้ดำเนินไปเป็นปกติ (วาสนา และเรวัตติ, 2555)

### 6.1 กระบวนการสังเคราะห์โพรลีนและการสะสมโพรลีน

การสังเคราะห์โพรลีนสามารถสังเคราะห์ได้จากกลูตาเมต และ ออร์นิทีน ในกระบวนการสร้างโพรลีนนั้น ประกอบด้วยการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญ 2 ชนิด ได้แก่ pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) และ pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR) โดยกระบวนการจะเริ่มจากกลูตาเมต ถูกรีดิวซ์ไปเป็น glutamate-semialdehyde (GSA) โดยเอนไซม์ P5CS ซึ่งขั้นตอนนี้เป็น rate limiting step ของกระบวนการสร้างโพรลีน หรือเป็นขั้นตอนที่ช้าที่สุดของปฏิกิริยา เป็นขั้นตอนที่ใช้กำหนดปฏิกิริยาว่าจะเกิดช้าหรือเร็วเพียงใด โดยจะต้องเป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับไม่ได้ หลังจากนั้น GSA จะเปลี่ยนไปเป็น pyrroline-5-carboxylate (P5C) และถูกเปลี่ยนไปเป็นโพรลีนด้วยเอนไซม์ P5CR (Szabados and Savoure, 2010) กระบวนการสังเคราะห์โพรลีนของพืชเกิดขึ้นภายในไซโทซอล และคลอโรพลาสต์ (ภาพที่ 3) โดยทั่วไปพืชจะมีการสะสมโพรลีนอยู่แล้วแต่มีอยู่ในระดับต่ำ (Gzik, 1996) เมื่ออยู่ในสภาวะขาดน้ำ กระบวนการสังเคราะห์โพรลีนจะถูกกระตุ้น ในขณะที่เดียวกันกระบวนการสลายโพรลีนจะถูกยับยั้งทำให้เกิดการสะสมโพรลีนขึ้น (Yoshida *et al.*, 1995) ภายใต้สภาวะเครียดการสะสมโพรลีนเกิดขึ้นโดยการทำงานของเอนไซม์ P5CS ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมและจำกัดอัตราการการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์โพรลีนทำหน้าที่เป็นสารออสโมไลต์ (osmolyte) โดยการสะสมโพรลีนจะเกิดขึ้นเมื่อพืชได้รับความเครียดทางกายภาพ เช่น สภาวะเครียดแล้ง และสภาวะเครียดเกลือ

## 6.2 กระบวนการสลายตัวของโพรลีน

การสลายตัวของโพรลีนในพืชเกิดขึ้นโดยกระบวนการออกซิเดชัน (oxidation process) โพรลีนที่สะสมอยู่จะถูกเปลี่ยนกลับไปเป็นกลูตาเมตอย่างรวดเร็วเมื่อความเครียดออกซิเดชันถูกปลดปล่อย หรือพืชเข้าสู่สภาวะปกติ โดยโพรลีนที่ถูกสร้างและสะสมไว้ในไซโทซอลจะเคลื่อนที่เข้ามาในไมโทคอนเดรีย ซึ่งเป็นโครงสร้างภายในเซลล์ที่เกิดกระบวนการโพรลีนออกซิเดชัน โดยการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ proline dehydrogenase (PDH) และ  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (P5CDH) โดยเริ่มจากโพรลีนถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ PDH ไปเป็น pyrroline-5-carboxylate (P5C) และถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ P5CDH จนได้กลูตาเมตที่สามารถกลับไปเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์โพรลีนได้ต่อไป กระบวนการสลายตัวของโพรลีนในไมโทคอนเดรียมีบทบาททางด้านสรีรวิทยาพืชหลายด้าน สามารถเพิ่ม energetic status ของเซลล์ทำให้สามารถบรรเทาสภาวะเครียดได้โดยเป็นแหล่งสะสมคาร์บอนและไนโตรเจน



ภาพที่ 3 กระบวนการสังเคราะห์โพรลีน

ที่มา : Kaur และ Asthir (2015)

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา และการตอบสนองทางสรีรวิทยาของยางพาราภายใต้สภาวะขาดน้ำ
2. เพื่อเปรียบเทียบและคัดเลือกพันธุ์ยางพาราที่มีแนวโน้มทนทานต่อสภาวะขาดน้ำ
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการสะสมโพรลีนและการแสดงออกของยีน *pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS)* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โพรลีนในต้นยางพาราภายใต้สภาวะขาดน้ำ

## บทที่ 2

### วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

#### วัสดุ /อุปกรณ์การวิจัย

##### 1. ตัวอย่างพืช

ต้นกล้วยพาราพันธุ์ PB 5/51, RRIT 251, RRIM 623, RRIM 600, RRIT 408 และ BPM 24 ที่ได้จากการเพาะเมล็ดที่รวบรวมจากแปลงเกษตรกร

##### 2. สารเคมี

###### 2.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอและหาลำดับนิวคลีโอไทป์

- 100 bp DNA Ladder
- Absolute ethanol
- Agarose
- Ampicillin
- Chloroform
- Deoxyribonuclease I (DNase I)
- Diethyl pyrocabonate
- Ethidium bromide
- Glycerol
- Isoamyl alcohol
- Isopropyl alcohol
- Phenol
- Sodium dodecyl sulfate (SDS)
- Sodium chloride
- Sodium acetate
- Tritone
- Tris-base

- Yeast extract
- Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA)
- *Taq* DNA Polymerase with ThermoPol™ Buffer (BioLabs)
- Deoxynucleotide (dNTP) Solution Set (BioLabs)
- E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit (Omega bio-tek, USA)
- E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit (Omega bio-tek, USA)

## 2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดโปรตีน

- Glacial acetic acid
- Hypophosphoric acid
- Ninhydrin
- Sulfosalicylic acid
- Toluene
- L-proline (Sigma Co.Ltd, MW 115.13)

## 2.3 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน

- 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix

## 3. แบคทีเรีย

*Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$

## 4. พลาสมิดดีเอ็นเอ

ชุด T&A cloning vector (RBC Bioscience)

## 5. อุปกรณ์สำหรับการทำวิจัย

- Autoclave
- BioDrop DUO UV/VIS Spectrophotometer

- Centrifuge
- Gel electrophoresis
- Gel documentation
- Hotplate
- Micropipette
- PCR Machine
- pH meter
- Real-Time PCR Machine (ABI 7300)
- Vortex mixer
- Water bath

#### **6. เครื่องมือทางสรีรวิทยาพืช**

- Data logger, DT-172
- Mettler Toledo™ FE30 FiveEasy™ Benchtop Conductivity Meters
- HH2+WET Sensor, Delta-T Device
- MultispeQ V.1, PhotosynQ

## วิธีการ

ทดลองในต้นกล้ายางพาราอายุ 5 เดือน ที่ได้จากการเพาะเมล็ดจำนวน 6 พันธุ์ ได้แก่ PB 5/51, RRIT 408, RRIM 623, RRIM 600, BPM 24 และ RRIT 251 ปลูกด้วยวัสดุปลูกหน้าดิน บรรจุในกระถางพลาสติกขนาด 12 นิ้ว จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ต้น วางปลูกในโรงเรือน ให้น้ำทุก 2 วัน ตลอดระยะการเตรียมต้นกล้า หลังจากนั้นชักนำให้เกิดสภาวะขาดน้ำ สำหรับชุดควบคุม (วันที่ 0) ทำการให้น้ำแก่ต้นพืชอย่างเต็มที่แล้วบันทึกข้อมูลหลังจากนี้ระบายออกจนหมด ตามด้วย 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตามลำดับ บันทึกข้อมูลและเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ดังนี้

### 1. อุณหภูมิ ความชื้นอากาศ และความชื้นดิน ภายใต้สภาวะโรงเรือน

บันทึกอุณหภูมิ และความชื้นอากาศรายชั่วโมง ภายในโรงเรือนที่ทำการทดลองด้วยเครื่อง Data logger รุ่น DT-172 โดยบันทึกข้อมูลตลอดช่วงการงดน้ำ 0 - 11 วัน

บันทึกปริมาณความชื้นในดิน (soil moisture content) ด้วยเครื่องมือวัดความชื้นดิน (HH2+WET Sensor, Delta-T Device) โดยปัก probe ลงดินที่ความลึก 10 เซนติเมตร จำนวน 3 ต้นต่อทรีตเมนต์ ต้นละ 3 ตำแหน่ง วัดค่าหลังงดน้ำเป็นเวลา 0 (ชุดควบคุม), 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน

### 2. ศึกษาการตอบสนองทางสัณฐานวิทยา

บันทึกภาพต้นกล้ายางพารา และให้คะแนนการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นยางพาราในทุกช่วงการงดน้ำ ได้แก่ 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน (ภาพที่ 4) เพื่อเปรียบเทียบพันธุ์ที่สามารถทนทานและไวต่อสภาวะขาดน้ำ ประเมินจากลักษณะทางกายภาพที่ปรากฏโดยให้คะแนนดังนี้

- 1 ต้นยางพาราเป็นปกติ
- 2 ใบเริ่มแสดงอาการเหี่ยว
- 3 ใบแสดงอาการเหี่ยวชัดเจน มุมใบเริ่มเปลี่ยนเล็กน้อย
- 4 ใบ และก้านใบเหี่ยว เริ่มพบการเหี่ยวของปลายยอด และมุมใบเปลี่ยน
- 5 ใบ ก้านใบ และปลายยอดเหี่ยว มุมใบเริ่มเปลี่ยน



ภาพที่ 4 ระดับการประเมินลักษณะอาการที่ปรากฏของยางพาราหลังขาดน้ำ (1: ต้นยางพาราเป็นปกติ 2: ใบเริ่มแสดงอาการเหี่ยว 3: ใบแสดงอาการเหี่ยวชัดเจน มุมใบเริ่มเปลี่ยนเล็กน้อย 4: ใบ และก้านใบเหี่ยว เริ่มพบการเหี่ยวของปลายยอด และมุมใบเปลี่ยน 5: ใบ ก้านใบ และปลายยอดเหี่ยว มุมใบเริ่มเปลี่ยน)

### 3. ศึกษาการตอบสนองทางสรีรวิทยาภายใต้สภาวะขาดน้ำในยางพารา

#### 3.1 ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในพืช (relative water content: RWC)

ค่า RWC เปรียบเทียบความสัมพันธ์ของปริมาณน้ำในพืช (นิศาชล และคณะ, 2555) โดยเก็บตัวอย่างใบพาสลาด ตัดเป็นชิ้นที่มีขนาด 1 ตารางเซนติเมตร นำมาชั่งน้ำหนักสด น้ำหนักช่วงที่เซลล์เต่ง (แช่น้ำกลั่น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วางไว้ในที่มืด) และน้ำหนักแห้ง (อบชิ้นส่วนใบพืชที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง) แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณโดยสูตร

$$RWC (\%) = \left( \frac{FW-DW}{TW-DW} \right) \times 100$$

โดย FW (Fresh Weight)	คือ น้ำหนักสดของพืช (กรัม)
TW (Turgid Weight)	คือ น้ำหนักพืชที่เต่งตัวเต็มที่ (กรัม)
DW (Dry Weight)	คือ น้ำหนักแห้งของพืช (กรัม)



### 3.2 การรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ (electrolyte leakage: EL)

ตรวจสอบความเสียหายของเซลล์พืชหลังจากขาดน้ำ โดยวัดการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ของใบยางพารา (นิศาชล และคณะ, 2555) เก็บตัวอย่างใบยางพาราในแต่ละช่วงของการงดน้ำ ได้แก่ 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออนล้างแผ่นใบ ตัดใบขนาด  $1 \times 0.5$  เซนติเมตร จำนวน 12 ชิ้น ใส่ขวดทดลองแล้วเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 30 มิลลิลิตร เขย่าแล้ววางไว้ในที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที วัดค่าการนำไฟฟ้า โดยจุ่มเซนเซอร์หัววัดของเครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า (Mettler Toledo) ลงไปในสารละลาย (conductivity: C1) นำสารละลายที่มีแผ่นใบอยู่ไป autoclave จากนั้นทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้ววัดค่าการนำไฟฟ้าอีกครั้ง (conductivity: C2) นำค่าที่ได้คำนวณหาปริมาณการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ตามสมการ

$$EL (\%) = \left( \frac{C1}{C2} \right) \times 100$$

### 3.3 ประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงของคลอโรฟิลล์ (maximum quantum efficiency of photosystem II, Fv/Fm)

บันทึกค่าประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงของคลอโรฟิลล์ ในใบยางพาราโดยใช้เครื่องมือ MultispeQ V.1 ค่าที่ได้จากเครื่องมือเป็นค่า Phi2 แสดงถึงพลังงานแสงที่ได้รับโดยระบบ photosystem II ซึ่งนำไปสู่ปฏิกิริยาเคมีในการสร้างพลังงาน และน้ำตาลเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของพืช โดยเครื่องสามารถแสดงค่าอยู่ในช่วง 0 - 0.82 โดยสุ่มวัดใบยางพารา ระยะใบเพสลาด จำนวน 3 ต้น ต้นละ 3 ใบ ใบละ 3 ค่า

### 3.4 ปริมาณคลอโรฟิลล์สัมพัทธ์ (relative chlorophyll content)

ค่า Relative chlorophyll content เปรียบเทียบความสัมพันธ์ของปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบพืช บันทึกค่าปริมาณคลอโรฟิลล์โดยใช้เครื่อง MultispeQ V.1 ค่าที่ได้จากเครื่องมือเป็นค่า relative chlorophyll content บ่งบอกถึงสัดส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบพืช ซึ่งแสดงอยู่ในช่วง 0 - 80 เป็นการประเมินปริมาณคลอโรฟิลล์โดยไม่ทำลายตัวอย่างใบพืช โดยสุ่มวัดใบเพสลาดของใบยางพารา จำนวน 3 ต้น ต้นละ 3 ใบ ใบละ 3 ค่า

#### 4. ศึกษาการแสดงออกของยีน P5CS และการสะสมโพรตีนในยางพารา

##### 4.1 สกัดอาร์เอ็นเอ

เก็บตัวอย่างใบในระยะเพสลาด บริเวณฉัตรบนสุดของต้นกล้ายางพาราพันธุ์ PB 5/51 ซึ่งเป็นตัวแทนของยางพาราที่ไวต่อสภาวะขาดน้ำ และยางพาราพันธุ์ RRIT 408 และ RRIM 623 ตัวแทนของยางพาราที่ทนทานต่อสภาวะขาดน้ำ นำมาสกัดอาร์เอ็นเอ โดยบดในโกร่งที่เติม ไนโตรเจนเหลว ย้ายเนื้อเยื่อที่บดละเอียดใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ เติม Extraction buffer (0.1M LiCl 0.1M Tris-HCl 0.01M EDTA และ 2% SDS) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร Phenol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และ Chloroform isoamyl ปริมาตร 300 ไมโครลิตร กลับหลอดไปนานาน 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายชั้นบน (upper phase) เติม phenol:chloroform:isoamyl (25:24:1) ปริมาตรหนึ่งเท่าของส่วนใส กลับหลอดไปมา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายชั้นบน เติม chloroform isoamyl ปริมาตรหนึ่งเท่าของส่วนใสเพื่อสกัดแยกโปรตีน กลับหลอดไปมา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (หากยังคงพบตะกอนโปรตีนซึ่งมีลักษณะสีขาวขุ่น ให้เติม chloroform isoamyl เพื่อสกัดซ้ำอีก รอบ) เก็บสารละลายชั้นบน เติม isopropanol ปริมาตรหนึ่งเท่าของส่วนใส และเติม sodium acetate ปริมาตร 1/10 เท่าของส่วนใสเพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอ กลับหลอดไปมาเบาๆ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายออก แล้วล้างตะกอนด้วย Ethanol 70% 2 ครั้ง ระบายแห้งแอลกอฮอล์ ละลายด้วยน้ำ RNase-free ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติม Extraction buffer ปริมาตรหนึ่งเท่าของส่วนใส เติม phenol:chloroform:isoamyl (25:24:1) ปริมาตรสองเท่าของส่วนใส กลับหลอดไปมาปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลายชั้นบน เติม chloroform isoamyl ปริมาตรหนึ่งเท่าของส่วนใส กลับหลอดไปมาปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลายชั้นบน เติม 8M LiCl ปริมาตร 1/3 ของส่วนใส กลับหลอดไปมาเบาๆ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายแล้วล้างตะกอนด้วย 2M LiCl ปริมาตร 1/3 ของส่วนใส ดูด 2M LiCl ออกให้หมด แล้วล้างตะกอนด้วย Ethanol 70% 2 ครั้ง ระบายแห้งแอลกอฮอล์ ละลายตะกอนด้วยน้ำ RNase-free ปริมาตร 25-30 ไมโครลิตร ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของสารละลายอาร์เอ็นเอโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

## 4.2 การสังเคราะห์ cDNA

อาร์เอ็นเอที่สกัดได้ถูกเติม DNase เพื่อสลายพันธะระหว่างหมู่ฟอสเฟต และน้ำตาลที่เป็นโครงสร้างหลักในโมเลกุลของดีเอ็นเอ การสังเคราะห์ cDNA ทำโดยใช้ชุดสำเร็จรูป Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA) ผสมสารละลายต่างๆ ได้แก่ total RNA 500-600 นาโนกรัม Oligo dT primer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร dNTP mix ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และเติม DI-DEPC ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 15 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติมสาร 5x RT buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร และ Maxima H Minus Enzyme Mix ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และอุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของ cDNA โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง

## 4.3 การโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทป์ของยีน *P5CS*

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *P5CS* ด้วยเทคนิค Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) ออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *P5CS* ของพืชอื่นที่มีลักษณะใกล้เคียงกับยางพารา จากฐานข้อมูล GenBank ซึ่งใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Eucalyptus camaldulensis*, *Prunus persica* และ *Jatropha curcas* มาเปรียบเทียบการจัดลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotides sequence alignment) เพื่อหาบริเวณที่เหมือนกันของยีนนำมาออกแบบไพรเมอร์ส่วนกลางยีน (degenerate primer) เมื่อได้ส่วนกลางยีนจึงสามารถออกแบบไพรเมอร์สำหรับหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาย 3' และ 5' (specific primer) เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีน *P5CS* ในยางพารา ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับโคลนยีนแสดงดังตารางที่ 2

### 4.3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

cDNA ที่สังเคราะห์ได้จาก mRNA ถูกนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ร่วมกับ degenerate specific primer (ตารางที่ 2) โดยใช้ปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มปริมาณเส้นดีเอ็นเอ โดยใช้อุณหภูมิที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที ตามด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทป์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลนยีน P5CS

Primers	Sequence of primer 5'-3'	Tm (°C)	Expected sizes (bp)	Function
P52-F	5' GAGCTMAAAGCYGATCTTCT 3'	58	724	Degenerate primer
P52-R	5' AGWAGCCCATTCCCCTTC 3'	58		Degenerate primer
P53-F	5' GTGGGAATGGGCTWCTCT 3'	56	569	Degenerate primer
P53-R	5' AGTRTGYGCACTTCCATG 3'	54		Degenerate primer
P5-F3	5' ATGAATGATGGCATGGATCG 3'	60	796	Specific primer
P58-R2	5' CTCMGGAGCATACCCACTGGT 3'	59		Specific primer
P57-F2	5' CGATGTGTATGCTGCCAT 3'	52		Specific primer
B25	5' GACTCTAGACGACATCGA 3'	50	394	Universal primer
B26	5'GACTCTAGACGACATCGATTTTTT TTTTTTTTTTTTT 3'	56		Universal primer

#### 4.3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล

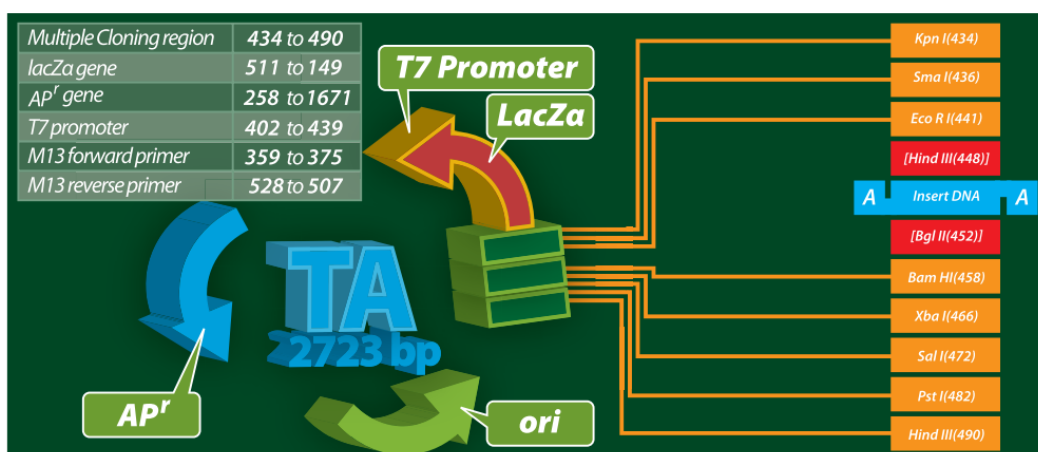
ตรวจสอบผลผลิต PCR โดยการทำให้เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ด้วยเจลอะกาโรส 1% ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ สกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยชุดสำเร็จรูป E.Z.N.A.<sup>®</sup> Gel Extraction Kit โดยตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ ชั่งน้ำหนักชิ้นวันที่ตัดได้เพื่อเติม binding buffer (อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร) นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที กลับหลอดไปมาทุกๆ 2-3 นาที ย้ายสารละลายดีเอ็นเอบรรจุในหลอดคอลัมน์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ผ่านแผ่นกรอง แล้วนำหลอดด้านล่างมาใช้ใหม่ เติม binding buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์เดิม แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ผ่านแผ่นกรอง แล้วนำหลอดด้านล่างมาใช้อีกครั้ง เติม wash buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงในหลอดคอลัมน์ ทิ้งสารละลายที่ผ่านแผ่นกรอง แล้วนำหลอดด้านล่างมาใช้ใหม่ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ย้ายหลอดคอลัมน์ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ เติม elution buffer ตรงกลางแผ่นกรองปริมาตร 30 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 4.3.3 การเชื่อมต่อเส้นดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอพาหะ

เชื่อมต่อเส้นดีเอ็นเอเป้าหมายกับดีเอ็นเอพาหะ โดยใช้ชุดสำเร็จรูป RCB TA cloning vector kit (RBC Bioscience) ซึ่งมีโครงสร้างของดีเอ็นเอพาหะดังภาพที่ 5 มีขั้นตอนเตรียมสารดังนี้

DNA target (200 นาโนกรัม)	3 ไมโครลิตร
TA vector (50 นาโนกรัม)	2 ไมโครลิตร
T <sub>4</sub> DNA ligation buffer A	1 ไมโครลิตร
T <sub>4</sub> DNA ligation buffer B	1 ไมโครลิตร
T <sub>4</sub> DNA ligast (3 U)	1 ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	10 ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง



ภาพที่ 5 แผนภาพโครงสร้าง TA พลาสมิด

ที่มา : <https://www.rcbioscience.com/>

### 4.3.4 การส่งถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

ส่งถ่ายดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์คอมพิเทนต์ (competent cell) ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ด้วยวิธี heat shock โดยนำ competent cell ที่เตรียมและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาละลายบนน้ำแข็ง เติมพลาสมิดดีเอ็นเอที่ต้องการถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียลงในหลอดที่บรรจุ competent cell บ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ย้ายหลอดไปจุ่มแช่ใน water bath อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที

เป็นเวลา 5 นาที เติมหอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth 800 มิลลิลิตรลงในหลอด เขย่าเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเชื้อที่เลี้ยงไว้ไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อคัดอาหารเหลวบางส่วนออกแล้วนำเซลล์แบคทีเรียที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหาร LB agar ที่ผสมยาปฏิชีวนะ (Ampicillin 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง ตรวจสอบโคโลนีที่มียีน *P5CS* ด้วยเทคนิค PCR

#### 4.3.5 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากเซลล์แบคทีเรีย

เชื้อโคโลนีเดี่ยวซึ่งเป็นโคโลนีที่ตรวจสอบแล้วว่าเป็นยีน *P5CS* เลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะ (Ampicillin 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง นำเชื้อที่เลี้ยงไว้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทอาหารเหลวด้านบนทิ้ง เพื่อนำตะกอนเซลล์ไปสกัดแยกพลาสมิดดีเอ็นเอออกจากเซลล์แบคทีเรีย ด้วยชุดสำร็จรูป E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit (Omega bio-tek) โดยเติม solution I ที่ผสม RNaseA เรียบร้อยแล้ว ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ละลายตะกอนเซลล์ จากนั้นเติม solution II ปริมาตร 250 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ เติม solution III ปริมาตร 350 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ จะสังเกตเห็นตะกอนสีขาว ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 นาที ดูดสารละลายชั้นบนใส่หลอดคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายในหลอดด้านล่างทิ้งแล้วนำหลอดกลับมาใช้ใหม่ เติม HBC buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายในหลอดด้านล่างทิ้งแล้วนำหลอดกลับมาใช้อีกครั้ง ล้างตะกอน 2 รอบโดยเติม DNA wash buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อีกครั้งเป็นเวลา 2 นาทีเพื่อชะสารละลายออกจนหมด ย้ายหลอดคอลัมน์ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ เพื่อเติมน้ำ DEPC เพื่อชะพลาสมิดดีเอ็นเอออกจากแผ่นกรอง เก็บสารละลายพลาสมิดดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

#### 4.4 ศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* ในสภาวะขาดน้ำ

วางแผนการทดลองเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* ในสภาวะขาดน้ำ โดยควบคุมการให้น้ำในต้นกล้าข่างพารา โดยแบ่งต้นข่างพาราออกเป็น 7 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 3 ต้น ประกอบด้วยชุดควบคุมซึ่งไม่มีการงดน้ำ และชุดทดลองที่งดน้ำเป็นเวลา 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน

สกัดอาร์เอ็นเอจากชิ้นส่วนใบของยางพาราพันธุ์ PB 5/51 RRIT 408 และ RRIM 623 ของแต่ละทรีตเมนต์ และแปลงเป็น cDNA เพื่อนำไปวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *P5CS* ด้วยเทคนิค quantitative real time PCR (qRT-PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงกับยีน *P5CS* ของยางพาราที่โคลนได้ ดังแสดงในตารางที่ 3 และใช้ 18S rRNA เป็นยีนอ้างอิง ปฏิบัติ PCR ประกอบด้วย 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix cDNA ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม ไพรเมอร์ forward และ reverse ความเข้มข้นชนิดละ 25 ไมโครโมลาร์ และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 ไมโครลิตร ด้วยน้ำ DI-DEPC ทำปฏิกิริยาโดยใช้เครื่อง Real-Time PCR Machine (ABI 7300) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ denaturation 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที และอุณหภูมิ Annealing และ Extension 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 40 รอบ เครื่องแสดงผลเป็นค่า Ct นำค่าที่ได้มาเทียบกับชุดควบคุมด้วยวิธี  $\Delta\Delta CT$  method (Livak and Schmittgen, 2001) เพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทป์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *P5CS* ของยางพารา

Primers name	Direction	Primer Sequences (5'-3')
P5-RT2-F	Forward	ATTCCTGTTCTGGGTCATGC
P5-RT2-R	Reverse	CCAGTCTGCACCAAATCCTT
18S-F	Forward	AAGCCTACGCTGTGGATACATT
18S-R	Reverse	CCCGACTGTCCCTGTTAATC

#### 4.5 การวัดปริมาณโพรตีน

สกัดโพรตีนของยางพาราจำนวน 3 พันธุ์ ซึ่งเป็นตัวแทนของยางพารากลุ่มหนานทานต่อสภาวะขาดน้ำ ได้แก่ RRIT 408 และ RRIM 623 และกลุ่มอ่อนแอต่อสภาวะขาดน้ำ ได้แก่ PB 5/51 ที่งดน้ำเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน จำนวนทรีตเมนต์ละ 3 ต้น โดยดัดแปลงวิธีของ Bates และคณะ (1973) ทำการชั่งน้ำหนักใบ 0.5 กรัม บดตัวอย่างให้ละเอียดโดยใช้ไนโตรเจนเหลว เติม sulfosalicylic acid ความเข้มข้น 3% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 15-30 นาที แล้วกรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง นำสารละลายที่กรองได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติมสาร acid ninhydrin ปริมาตร 4 มิลลิลิตร กระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาโดยให้ความร้อน 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาทันทีโดยแช่ในอ่างน้ำแข็ง เติม toluene ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายเข้ากัน สารละลายจะแยกเป็นสองชั้น ใช้เฉพาะส่วนชั้นบน

ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วย UV-visible spectrophotometer เปรียบเทียบความเข้มข้นของโพรลีนในตัวอย่างกับสมการโพรลีนมาตรฐาน (Standard proline)

## 5. วิเคราะห์ผลข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) วิเคราะห์ค่าเฉลี่ย และความแปรปรวนของข้อมูลด้วยโปรแกรม R version 2.14.0 และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

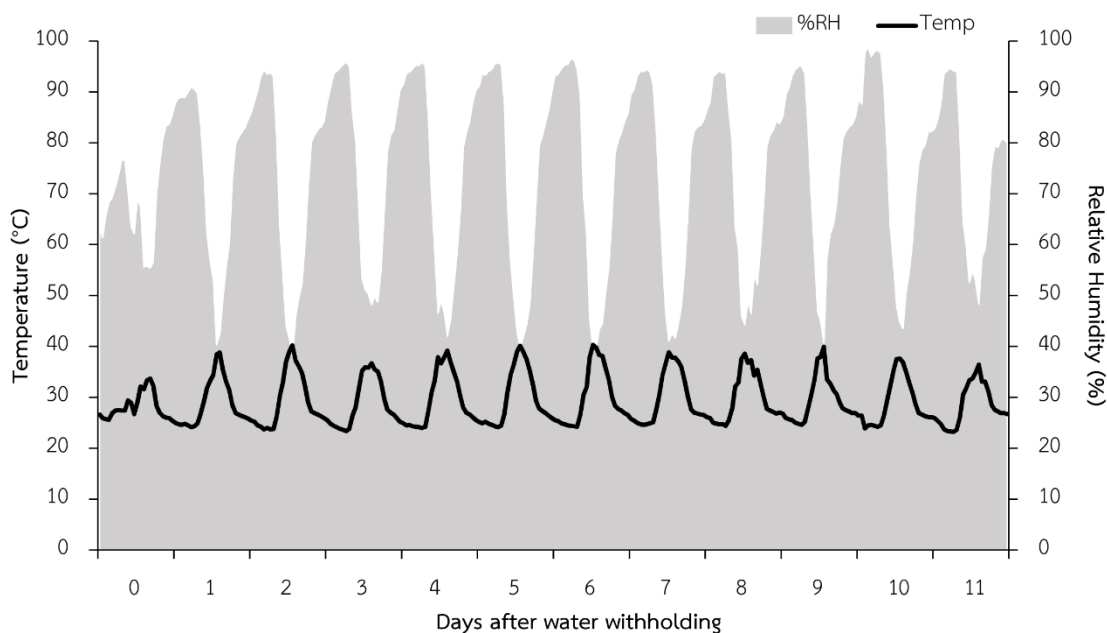


### บทที่ 3

#### ผล

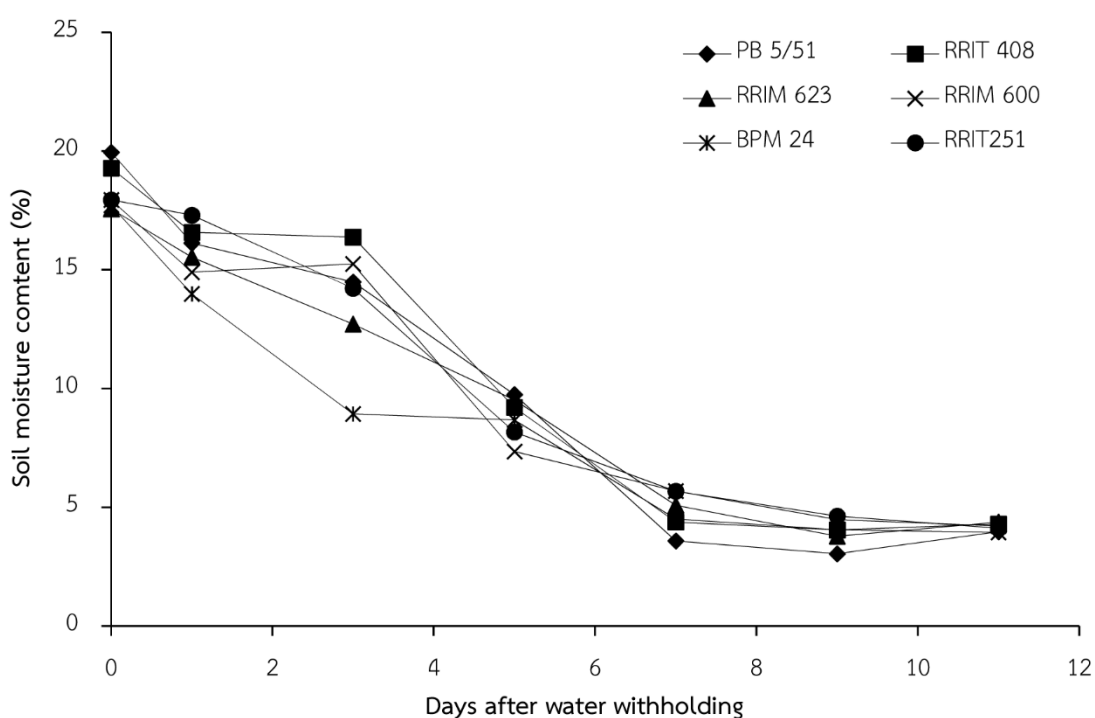
#### 1. อุณหภูมิ ความชื้นอากาศ และความชื้นดิน ภายใต้สภาวะโรงเรือน

จากการวัดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและความชื้นของอากาศภายในโรงเรือน ตลอดการทดลอง พบว่า ภายในโรงเรือนมีอุณหภูมิต่ำสุดที่ 23.2 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดที่ 40.3 องศาเซลเซียส โดยสูงสุดในช่วงเวลากลางวัน และลดลงในช่วงเวลากลางคืน ส่วนค่าความชื้นสัมพัทธ์ มีค่าต่ำสุด 38.1% ความชื้นสัมพัทธ์สูงสุด 98.9% โดยสูงสุดในช่วงเวลากลางคืน และลดลงในช่วงเวลากลางวัน แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิและความชื้นในทุกๆ วันมีการเปลี่ยนแปลงที่ในทิศทางเดียวกัน (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ภายในโรงเรือน ตั้งแต่วันทิ้งน้ำ 0 - 11 วัน ในช่วงเดือน กุมภาพันธ์ ปี พ.ศ. 2561

ความชื้นดินในภาชนะปลูกก่อนงดการให้น้ำ และต้นที่งดการให้น้ำมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด โดยก่อนการงดน้ำวัดความชื้นดินได้ที่ 17.6-19.9% หลังจากนั้นในช่วงการขาดน้ำ 1-7 วัน ความชื้นในดินลดลงประมาณ 3-4% ของแต่ละช่วงวันในการงดน้ำ และหลังจากขาดน้ำ 9-11 วัน พบว่า ความชื้นดินมีค่าลดลงเพียงเล็กน้อยและลดลงต่ำสุดเมื่อระยะเวลาในการงดการให้น้ำเป็นเวลา 11 วัน ความชื้นดินที่วัดได้อยู่ที่ 3.9-4.4% (ภาพที่ 7) สำหรับความชื้นดินในกระถางของยางพาราแต่ละพันธุ์ พบว่า ในทุกช่วงมีค่าใกล้เคียงกัน ยกเว้น BPM 24 มีค่าความชื้นดินต่ำกว่าพันธุ์อื่นๆ หลังการงดการให้น้ำเป็นเวลา 3 วัน

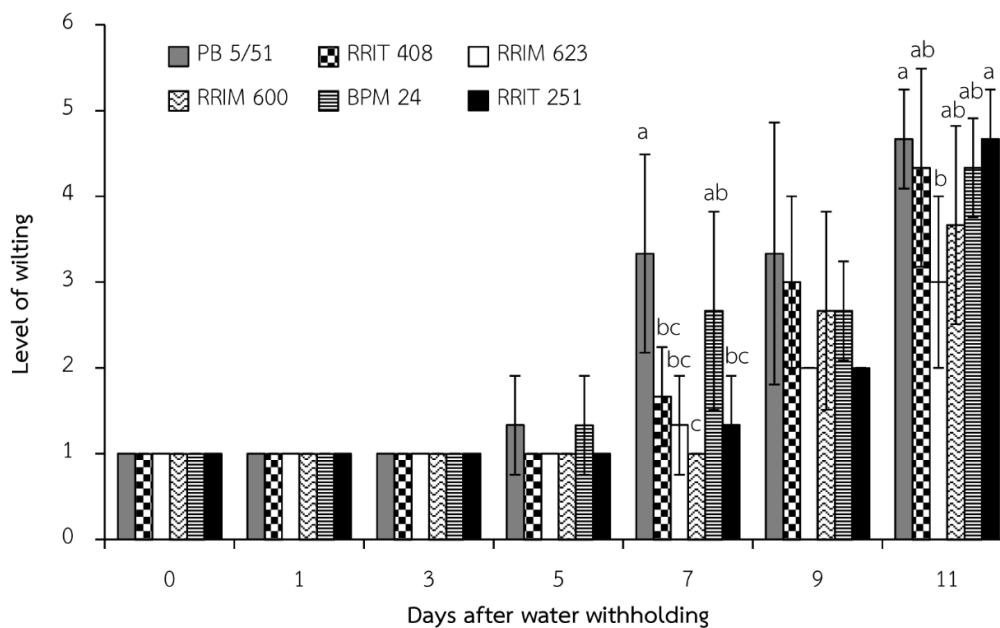


ภาพที่ 7 ปริมาณความชื้นดินในภาชนะปลูกยางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน

## 2. ศึกษาการตอบสนองทางสัณฐานวิทยา

จากการบันทึกภาพถ่ายลักษณะสัณฐานของยางพาราทั้ง 6 พันธุ์ที่งดการให้น้ำที่ระยะเวลาต่างๆ พบว่า ในวันที่ 0, 1 และ 3 หลังการงดน้ำ ยางพาราทั้ง 6 พันธุ์ยังคงอยู่ในสภาพปกติ ไม่พบอาการขาดน้ำหรือการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา แต่หลังจาก 5 วันที่งดน้ำ พบความชื้นดินลดลง ยางพารามีอาการขาดน้ำโดยแสดงลักษณะแผ่นใบเหี่ยว ซึ่งเกิดขึ้นก่อนกับ

ยางพาราพันธุ์ PB 5/51 และ RRIM 600 กระทั่งในวันที่ 11 หลังการงดน้ำ ยางพาราแสดงอาการขาดน้ำที่รุนแรง โดยลักษณะอาการที่พบ คือ เหี่ยวของแผ่นใบ ก้านใบ และปลายยอด ตามลำดับ ลักษณะการเหี่ยวดังกล่าวเกิดขึ้นก่อนกับยางพาราพันธุ์ PB 5/51, RRIT 251, BPM 24, RRIT 408, RRIM 600 และ RRIM 623 ตามลำดับ (ภาพที่ 8 และ 9) ยางพาราพันธุ์ RRIM 623 แสดงอาการเหี่ยวของแผ่นใบหลังการงดน้ำเป็นเวลา 9 วัน และมมใบเริ่มเปลี่ยนเล็กน้อยหลังงดน้ำเป็นเวลา 11 วัน ซึ่งพบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงช้ากว่าพันธุ์อื่นๆ นอกจากนี้การตรวจสอบการตอบสนองทางสัณฐานวิทยาพบว่ามีความสัมพันธ์กับความชื้นดิน และปริมาณน้ำในใบ เมื่อความชื้นดินลดลงยางพาราเกิดการขาดน้ำ ส่งผลให้ปริมาณน้ำในใบลดลงด้วย แสดงให้เห็นได้อย่างชัดเจนจากลักษณะอาการเหี่ยวของต้นยางพารา จึงเลือกใช้การตอบสนองทางสัณฐานวิทยาเป็นหลักเกณฑ์หนึ่งในการแบ่งกลุ่มพันธุ์ยางพาราที่ทนทานต่อสภาวะขาดน้ำ และพันธุ์ยางพาราที่ไวต่อสภาวะขาดน้ำ เพื่อตรวจสอบการสะสมโปรตีน และการแสดงออกของยีน *P5CS*



ภาพที่ 8 ระดับอาการเหี่ยวของยางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD

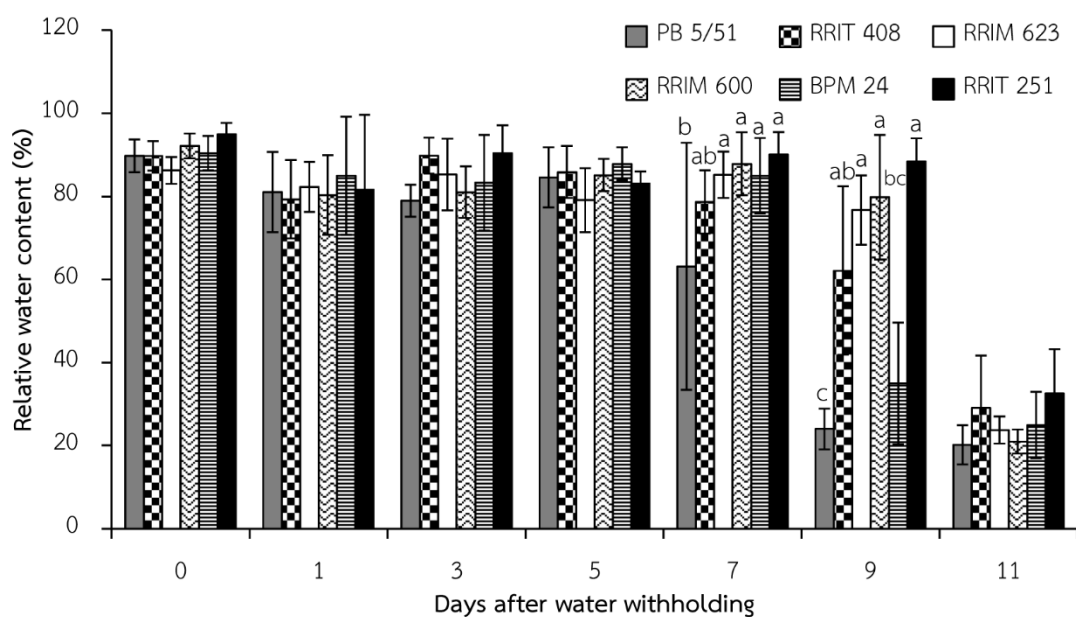


ภาพที่ 9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของยางพาราพันธุ์ PB 5/51 (A) RRIT 408 (B) RRIM 623 (C) RRIM 600 (D) BPM 24 (E) และ RRIT 251 (F) ภายใต้สภาวะขาดน้ำเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน

### 3. ศึกษาการตอบสนองทางสรีรวิทยาภายใต้สภาวะขาดน้ำในยางพารา

#### 3.1 ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในพืช

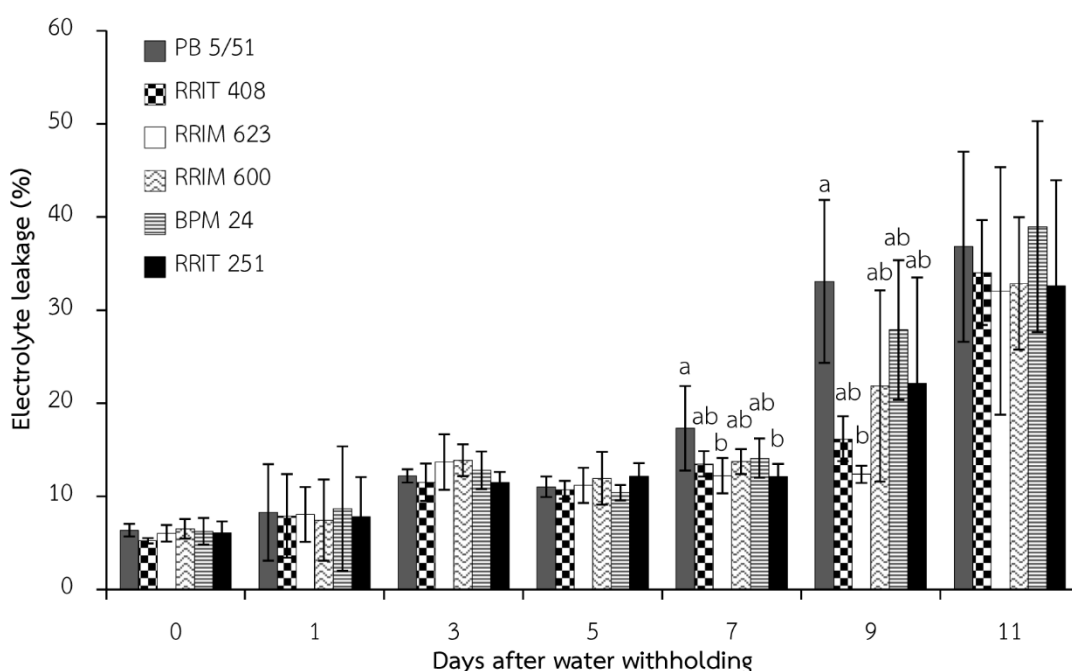
ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบของยางพารา 6 พันธุ์ พบว่า การงดน้ำเป็นเวลา 0-5 วันแรก ยางพาราทุกพันธุ์มีค่าปริมาณน้ำสัมพัทธ์ ที่ไม่แตกต่างกันโดยมีค่าอยู่ระหว่าง 78.98-94.95% แต่หลังจากงดน้ำเป็นเวลา 7, 9 และ 11 วัน ค่าที่ได้ลดต่ำลงเรื่อยๆ และต่ำสุดที่ 20.18% นอกจากนี้พบว่า ยางพาราพันธุ์ PB 5/51 มีค่า RWC ต่ำกว่าพันธุ์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญหลังจากงดการให้น้ำเป็นเวลา 7 วัน และลดต่ำลงเรื่อย เมื่อขาดน้ำ 9 และ 11 วัน ตามลำดับ (ภาพที่ 10) แสดงให้เห็นว่า ยางพันธุ์ PB 5/51 สามารถรักษาระดับน้ำในใบได้น้อยกว่าพันธุ์อื่น อาจจัดว่าเป็นพันธุ์ที่ไวต่อสภาวะแล้ง ส่วนยางพาราพันธุ์ RRIM 623, RRIM 600 และ RRIT 251 พบว่า หลังการงดการให้น้ำเป็นเวลา 9 วัน ทั้ง 3 พันธุ์มีปริมาณน้ำในใบสูงกว่าพันธุ์อื่นๆ แสดงให้เห็นว่ายางพันธุ์ RRIM 623, RRIM 600 และ RRIT 251 สามารถรักษาระดับน้ำในใบได้ดีกว่าพันธุ์อื่น อาจจัดว่าเป็นพันธุ์ที่ทนต่อสภาวะแล้งได้



ภาพที่ 10 ปริมาณน้ำในพืชของยางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P \leq 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD

### 3.2 การรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์

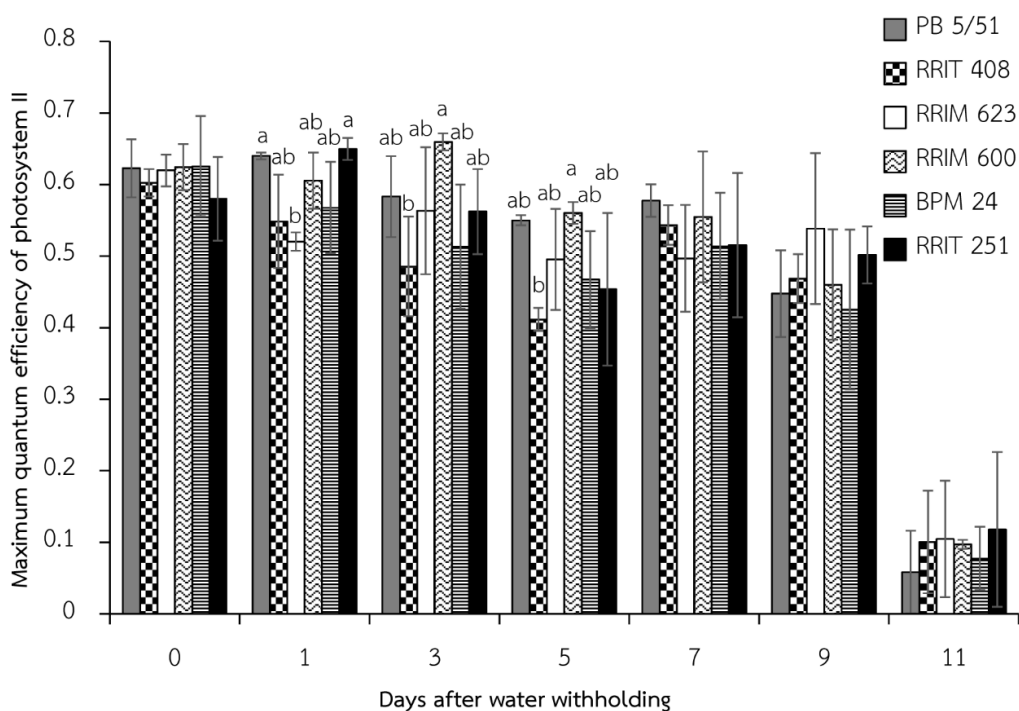
การรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ (EL) ของใบยางพารา 6 พันธุ์ พบว่า ในช่วง 5 วัน แรกหลังงดน้ำ ยางพาราทุกพันธุ์มีค่าการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ที่ใกล้เคียงกัน มีค่าการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์อยู่ที่ 5.25 - 13.69% หลังจากขาดน้ำเป็นเวลายาวนานขึ้นค่าการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งมีค่าถึง 32.04-38.97% ในวันที่ 11 (ภาพที่ 11) นอกจากนี้ยังพบว่ายางพาราพันธุ์ PB 5/51 ที่งดน้ำเป็นเวลา 7 วัน มีค่าการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ 17.33% มากกว่าพันธุ์อื่นๆ และต่างจากพันธุ์ RRIM 623 และ RRIT 251 อย่างมีนัยสำคัญ การรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ของทุกพันธุ์เพิ่มสูงขึ้นจนกระทั่งวันที่ 11 แสดงให้เห็นว่าเซลล์ของพืชได้รับความเสียหายจากการขาดน้ำทำให้มีการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ และพบยางพาราพันธุ์ RRIM 623 มีค่าการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์น้อยที่สุดหลังจากงดน้ำ 7, 9 และ 11 วัน แสดงว่ายางพาราพันธุ์ RRIM 623 มีความสามารถในการรักษาสภาพเซลล์ไม่ให้เกิดความเสียหายเมื่อเกิดการขาดน้ำมากกว่าพันธุ์อื่นๆ



ภาพที่ 11 การรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ของยางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P \leq 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD

### 3.3 ประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงของคลอโรฟิลล์

ค่าประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงของคลอโรฟิลล์ ในวันที่ 0 ก่อนการงดน้ำ ยางพาราทั้ง 6 พันธุ์ มีค่าที่ใกล้เคียงกันอยู่ที่ 0.58 - 0.63 และเมื่องดการให้น้ำ พบว่าค่าประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงของคลอโรฟิลล์มีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง ในทุกพันธุ์ และช่วงสุดท้ายที่งดการให้น้ำเป็นเวลา 11 วัน ค่าประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงของคลอโรฟิลล์ลดลงมีค่าอยู่ที่ 0.08 - 0.23 (ภาพที่ 12) แสดงให้เห็นว่าเมื่อยางพาราอยู่ในสภาวะขาดน้ำเป็นเวลานานประสิทธิภาพในการทนทานต่อสภาวะขาดน้ำลดลง ส่งผลให้ค่าประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงของคลอโรฟิลล์ในยางพาราลดลงอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างที่ชัดเจนระหว่างพันธุ์

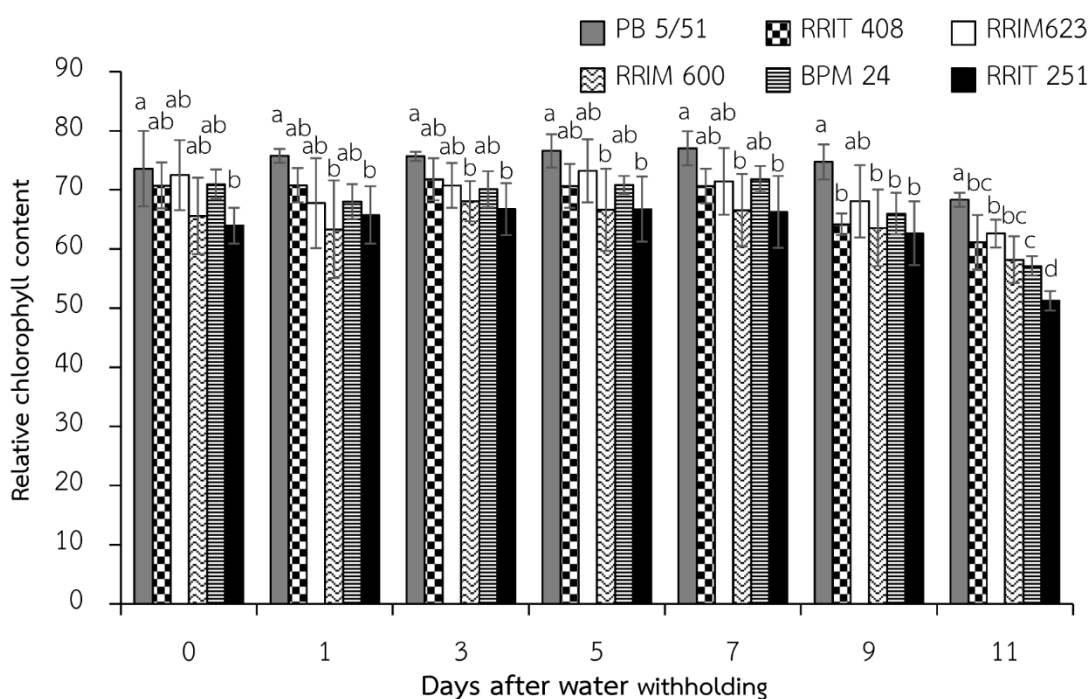


ภาพที่ 12 ค่าประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงของคลอโรฟิลล์ ของยางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P \leq 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD

### 3.4 ปริมาณคลอโรฟิลล์สัมพัทธ์

จากการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์สัมพัทธ์ในใบยางพารา 6 พันธุ์ พบว่า ก่อนการงดน้ำ ยางพาราทุกพันธุ์มีค่าปริมาณคลอโรฟิลล์ อยู่ที่ 63.96 - 73.60 ในช่วงแรกของการขาดน้ำปริมาณ

คลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งหลังจากขาดน้ำเป็นเวลา 9-11 วัน พบว่า ปริมาณคลอโรฟิลล์มีค่าต่ำลง โดยมีค่าต่ำสุดอยู่ที่ 51.26 - 68.32 นอกจากนี้ พบว่าในวันที่ 11 ยางพาราพันธุ์ PB 5/51 มีปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลงเพียง 7.72% ในขณะที่ RRIM 600, RRIT 408, RRIM 623, BPM 24 และ RRIT 251 ลดลง 12.72%, 15.67%, 15.76%, 24.18% และ 24.78% ตามลำดับ (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 ปริมาณคลอโรฟิลล์สัมพันธ์ของยางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD

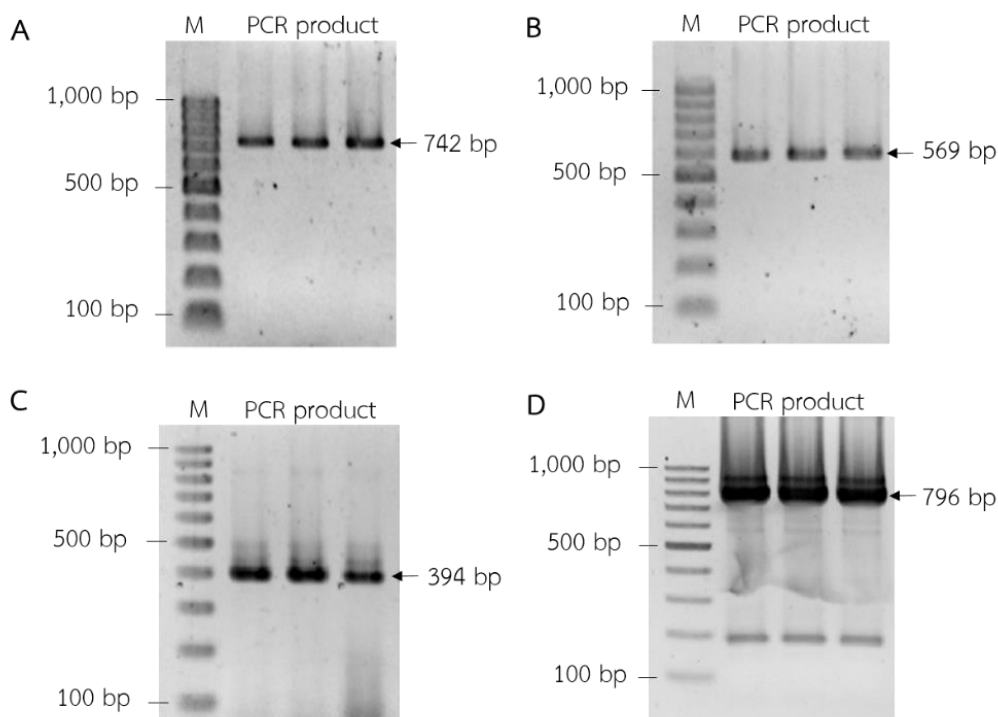
#### 4. ศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* และการสะสมโพรลีนในยางพารา

##### 4.1. ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *P5CS* ในยางพารา

นำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้จาก mRNA มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *P5CS* พบส่วนกลางของยีน (partial sequence) จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดย degenerate primer Forward : P52-F กับ Reverse : P52-R และไพรเมอร์ Forward : P53-F



กับ ไพรเมอร์ Reverse : P53-R เมื่อเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานพบว่ามีความยาวประมาณ 742 นิวคลีโอไทด์ และ 569 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ (ภาพที่ 14A และ 14B) จากการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายถูกสกัดแยกโดย E.Z.N.A.<sup>®</sup> Gel Extraction Kit และนำชิ้นดีเอ็นเอต่อเชื่อมกับเวกเตอร์ T&A cloning vector จากนั้น recombinant DNA ถูกถ่ายโอนเข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอ และคัดเลือกแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายโดยเลี้ยงบนอาหาร LB agar ที่มี ampicillin เป็น antibiotic โคโลนีที่ได้มีลักษณะขาวขุ่น นำไปตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์อีกครั้งก่อนนำไปสกัดแยกชิ้นส่วนยีนเป้าหมายออกจากแบคทีเรีย *E. coli* โดย E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid DNA Mini Kit ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้ผลโดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *P5CS* ใกล้เคียงกับ *Manihot esculenta* (accession number KX185617.1) *Jatropha curcas* (accession number GU170385.1) และ *Populus euphratica* (accession number EF412967.1) ระดับความคล้ายที่ 94, 90 และ 88% ตามลำดับ



**ภาพที่ 14** ลักษณะแถบดีเอ็นเอของยาร่างพาราที่ได้จากการทำพีซีอาร์ส่วนกลางของยีนด้วยไพรเมอร์ Forward: P52-F กับ Reward: P52-R (A) และ Forward: P53-F กับ Reward: P53-R (B) ส่วนปลาย 3' ด้วยไพรเมอร์ Forward: P57-F2 กับ universal primer B25 และ B26 (C) และ ส่วนปลาย 5' ด้วยไพรเมอร์ Forward: P5-F3 กับ Reward: P58-R2 (D) โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน DNA Ladder (M)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของ 3' race ได้ผลผลิต PCR จาก specific primer P57-F2 (forward) กับ universal primer B25 และ B26 (reverse) ซึ่งมีขนาดลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 394 bp (ภาพที่ 14C) สำหรับ 5' ได้ผลผลิต PCR จาก specific primer P5-F3 (forward) กับ P58-R2 (reverse) ซึ่งมีขนาดลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 796 bp (ภาพที่ 14D) และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายและส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับส่วนกลางยีน

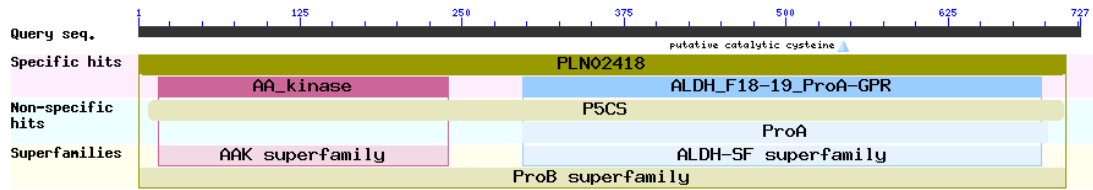
ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *P5CS* ในยางพาราที่พบมีขนาด 2,182 bp ค้นหาตำแหน่ง Open Reading Frame Finder (ORF) จากเว็บไซต์ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/> และ <http://reverse-complement.com/translate-protein/ROOT/> พบตำแหน่ง open reading frame (ORF) บริเวณ frame+1 แปรรหัสเป็นโปรตีนได้โปรตีนจำนวน 727 กรดอะมิโน ดังภาพที่ 15 โดยยังคงมีส่วนที่ขาดหายบริเวณปลาย 3' ของยีน ทำให้ไม่พบส่วน Stop codon ของยีน ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *P5CS* ของยางพาราที่ได้ถูกนำไป BLAST-N ด้วยเว็บไซต์ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> เพื่อตรวจสอบความเหมือนของสายดีเอ็นเอที่ได้ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *P5CS* ของยางพารามีความใกล้เคียงกับยีน *P5CS* ของ *Manihot esculenta* (JQ807809.1) 94%, *Jatropha curcas* (GU358610.1) 90%, *Populus euphratica* (EF412967.1) 87%, *Eurya emarginata* (KR363007.1) 84% และ *Prunus persica* (KP973956.1) 83% เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *P5CS* ที่สามารถแปรเป็นลำดับกรดอะมิโนเพื่อนำไปใช้ในการ BLAST-P ด้วยเว็บไซต์ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> พบตำแหน่ง AA\_kinase (Amino acid kinase family: Aspartokinase, Acetylglutamate kinase, Glutamate 5-kinase, Uridylate kinase และ Carbamate kinase) และ ALDH\_F18-19\_ProA-GPR (Gamma-glutamyl phosphate reductase (GPR), aldehyde dehydrogenase families 18 and 19) ของยีน *P5CS* (ภาพที่ 16) เมื่อนำลำดับกรดอะมิโน *P5CS* ของยางพารามาเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่น ๆ ด้วยโปรแกรม GeneDoc พบตำแหน่ง ATP binding site ตำแหน่งที่ 61-68, Conserved proline feedback inhibition amino acid residue Phe ตำแหน่งที่ 129, Conserved Leu zipper ตำแหน่งที่ 176-205, N-terminal Glutamate-5-kinase ตำแหน่งที่ 233-255, NAD(P)H binding site ตำแหน่งที่ 431-468 และ GSA-DH domains ตำแหน่งที่ 650-685 (ภาพที่ 17) ในการหาความสัมพันธ์ทางลำดับวิวัฒนาการของยีน *P5CS* ของยางพาราโดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *P5CS* ของยางพาราและพืชชนิดอื่นๆ เพื่อดูความใกล้ชิดทางพันธุกรรม ด้วยโปรแกรม MEGA 3.1 สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มของพืชใบเลี้ยงคู่ และกลุ่มพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ซึ่ง *HbP5CS* ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มที่ 1 มีความใกล้ชิดกับ *Manihot esculenta: MeP5CS* (JQ807809.1) 100% และ *Jatropha curcas: JcP5CS* (GU358610.1) 100% (ภาพที่ 18)

```

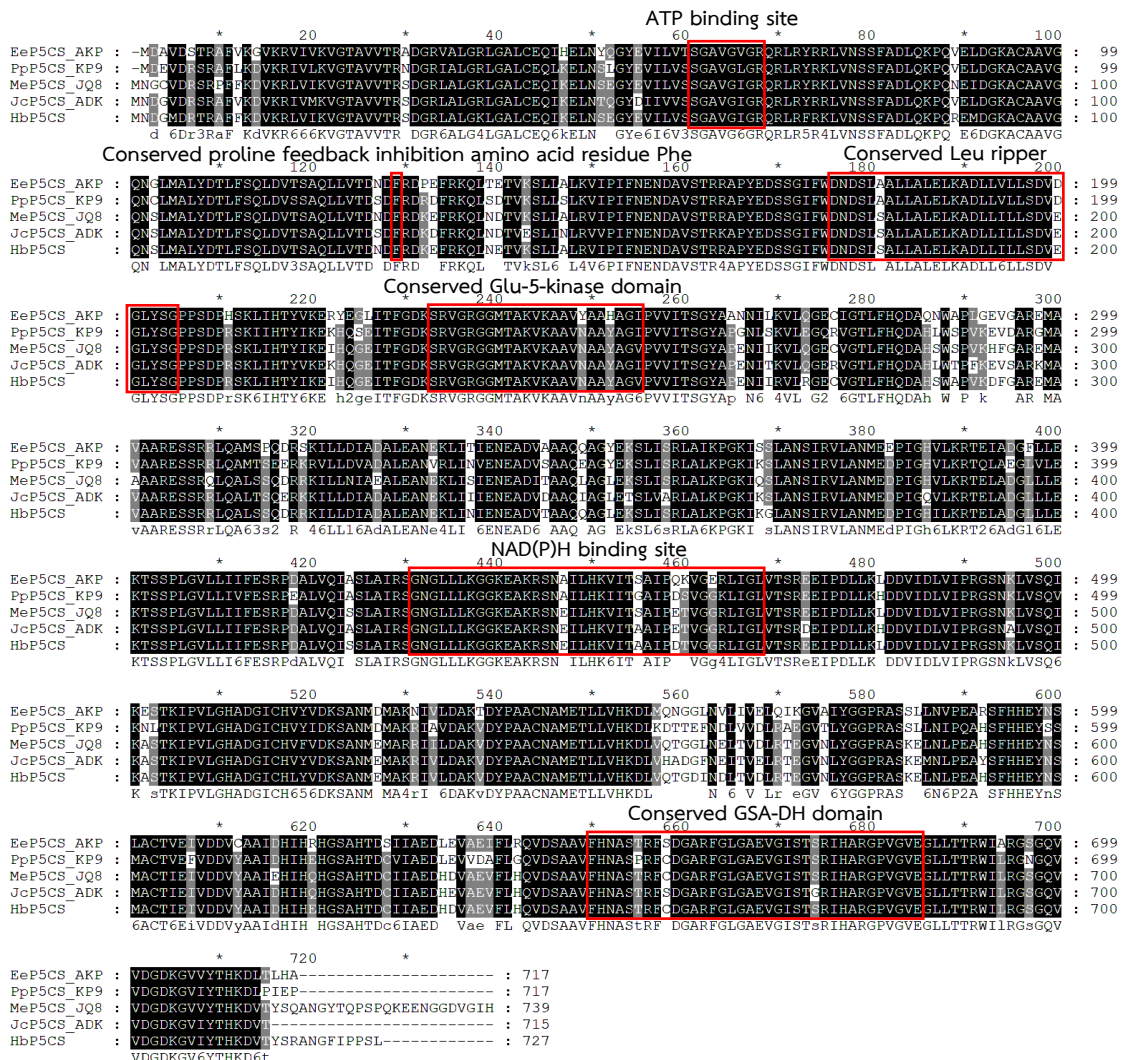
1 M N D G M D R T R A F F K D V K R L V I K V G T A V V T R S
  atgaaatgatggcatggatcggactcgcgctttttcaaagacgttaagcgtcttgatcaatcaagggtgggactgctgtgtgactagaagc
91 D G R L A L G K L G A L C E Q I K E L N S E G Y E V I L V S
  gatgggagattggcccttgggaaactaggagctccttgtgagcagattaagagttgaactctgaaggttatgaagttatgttgggtgca
181 S G A V G I G R Q R L R F R K L V N S S F A D L Q K P Q R E
  tcagtgccgcttggcattggcgcagaggctaagattccggaatttagtcaatagcagctttgctgacctccaaaagccacaacgtgaa
271 M D G K A C A A V G Q N S L M A L Y D T L F S Q L D V T S A
  atggatgggaaagcagcagctgttgacaaaaacagcctgatggctctttatgatacattgtttagtcagttggacgtgacatcagcg
361 Q L L V T D N D F R D K E F R K Q L N E T V K S L L A L R V
  cagcttctcgtgaccgataatgattttagggataaagagtttaggaagcaacttaatgagactgtgaaatcactgttagctctgagggtt
451 I P I F N E N D A V S T R R A P Y E D S S G I F W D N D S L
  atccctataatgaaatgatgctgttagtactaggagagctccatagaggattcttctggcattttttgggataatgacagttta
541 S A L L A L E L K A D L L I L L S D V E G L Y S G P P S D P
  tcagcttctgacttagagctaaaagctgatcttctcatcctgttgagtgatggagggtctttatagtgccctcctagtgaccaca
631 R S K L I H T Y I K E I H Q G E I T F G D K S R V G R G G M
  cgctccaagctgattcacatacattaaggaatacatcagggaataacttttggtgacaagtctagggttggagagggggcagtg
721 T A K V K A A V N A A Y A G V P V V I T S G Y A P E N I I R
  acagccaaagtaaaagctgctgtcaatgcagcttatgctggtgctcctgtgttataaccagtggtatgctcctgagaacataataga
811 V L R G E C V G T L F H Q D A H S W A P V K D F G A R E M A
  gtccctcgaggagagtggtggcaccctcttcatcaggatgcacattcatgggccccagttaaagactttggtgacgtgagatggca
901 V A A R E S S R R L Q A L S S Q D R R K I L L D I A D A L E
  gttgccgcaaggagagttccagacggcttcaggcattgtctcaagaatagggaataatgttctggtgataatgctgacgcttgaa
991 A N E K L I N I E N E A D V T A A Q Q A G L E K S L I S R L
  gccaatgaaaaactgatcaacattgaaatgaagctggttactgctgcacaacaggctggattggaaaaatccttaatatctcgctg
1081 A L K P G K I K G L A N S I R V L A N M E D P I G H I L K R
  gctttaaagcctggaagattaaagcccttgcaaatcaattcgtgtgcttgcaaacatggaagatccaattggtcatatgttgaagaa
1171 T E L A D G L L L E K T S S P L G V L L I I F E S R P D A L
  actgagcttgcgtgagactcctcttagagaagacatcatctcctttaggtgttctctgattatgtttagtctgcagaccagatgctg
1261 V Q I S S L A I R S G N G L L L K G G K E A K R S N E I L H
  gtgcagatattccttggcaattcgaagtggaatgggctactcttgaaggaggaaaaagggccaagcggtaaatgaaatgttgcac
1351 K V I T A A I P D T V G G R L I G L V T S R E E I P D L L K
  aaggttatcactgcagccatccagatactgttggtggaagacttattggactggtgacgtcaagagagaaatctctgatgctgctaa
1441 L D D V I D L V I P R G S N K L V S Q I K A S T K I P V L G
  cttgatgatgtaatcgatcttctgacccaagaggcagcaataaaactgtttctcaaatcaaacatcaactaaaatctctgttctgggt
1531 H A D G I C H L Y V D K S A N M E M A K R I V L D A K V D Y
  catgctgatggaattgtcatttatatgttgataagctgccaataggaaatggctaagcgcattgtctggtgcaaaagtagattat
1621 P A A C N A M E T L L V H K D L V Q T G D I N D L T V D L R
  ccagcagcctgcaatgcaatgaaacactgctgtccacaagatttgggtgcagactggtgacataaatgatctgacagttgatctcgc
1711 T E G V N L Y G G P R A S K E L N L P E A H S F H H E Y N S
  actgaaggtgttaattgtatgggggaccaagggcaagcaaggagctgaacctccagaagcattctttcatcagagtaacaattcc
1801 M A C T I E I V D D V Y A A I D H I H E H G S A H T D C I I
  atggcttgcaactatogaaatgttgacgatgtgatgctgocattgatcataatgacatggaagtgacataactgattgtattata
1891 A E D H D V A E V F L H Q V D S A A V F H N A S T R F C D G
  gcagaagatcatgatgttgcaagttttctacatcagggtgacagtgctgcagttttcataatgcaagcacaagattctgtgatgga
1981 A R F G L G A E V G I S T S R I H A R G P V G V E G L L T T
  gctcagatttggtttaggtgacagagttggaataagtagtagaattcatgctcggggtcctggtggagttgaaggtgctaaacaaca
2071 R W I L R G S G Q V V D G D K G V I Y T H K D V T Y S R A N
  agatggattcgaagggtagtgacaggttagtggtgataaaggggtgatatacccaagggcgttaacttatagtcgagcaaat
2161 G F I P P S L
  ggggtttataccgccctcactg

```

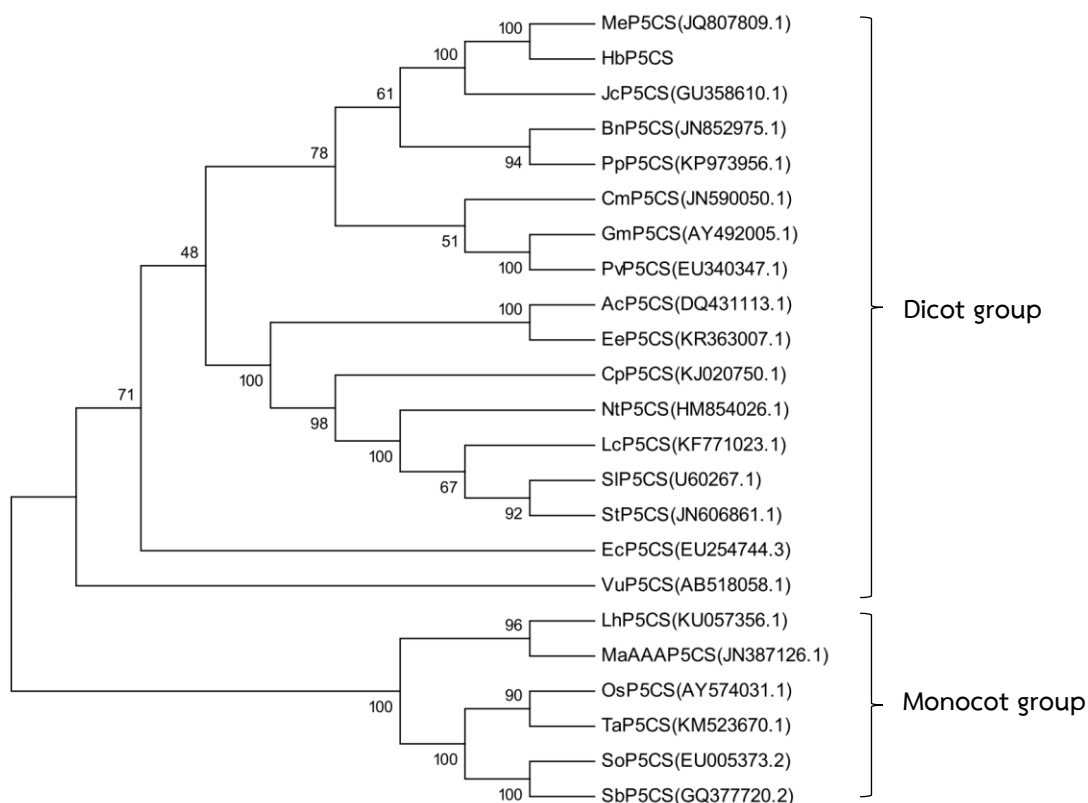
ภาพที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทป์ และกรดอะมิโนบางส่วนของยีน P5CS ในยางพารา



ภาพที่ 16 AA\_kinase (Amino acid kinase family) และ ALDH\_F18-19\_ProA-GPR (Gamma-glutamyl phosphate reductase (GPR), aldehyde dehydrogenase families 18 and 19) ตำแหน่งหลักที่เกิดการสังเคราะห์โปรตีนของยีน P5CS



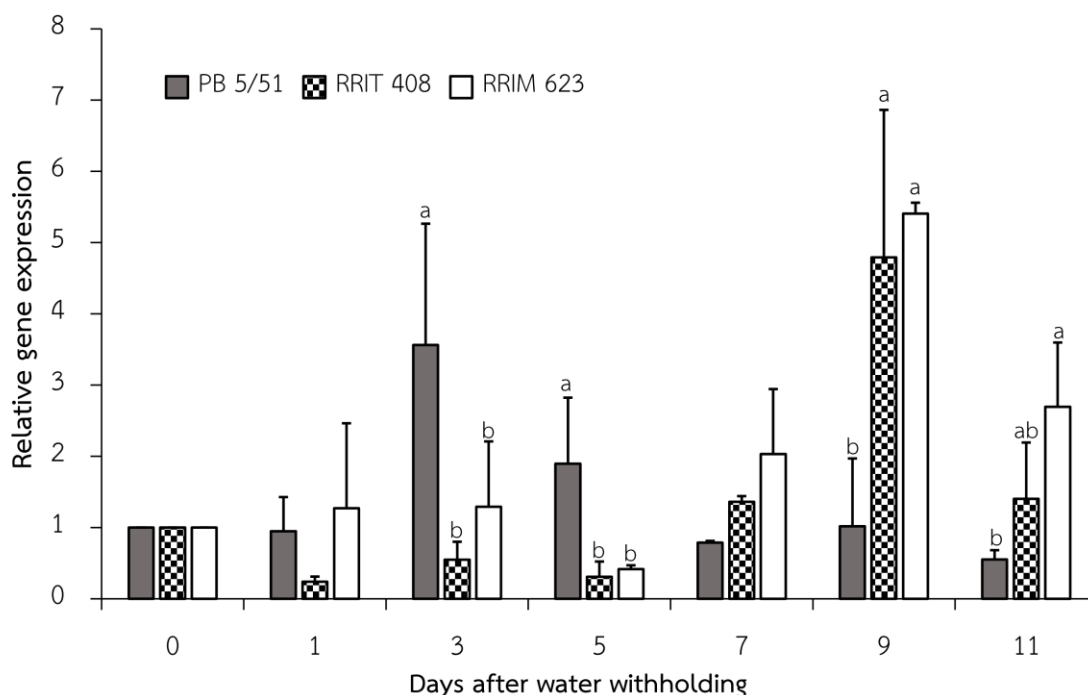
ภาพที่ 17 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนโปรตีน P5CS ของยีนพารากับ EeP5CS (*Eurya emarginata*: KR363007.1), PpP5CS (*Prunus persica*: KP973956.1), MeP5CS (*Manihot esculenta*: JQ807809.1) และ JcP5CS (*Jatropha curcas*: GU358610.1) จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม GeneDoc



**ภาพที่ 18** Phylogenetic tree ของยีน *P5CS* ในยางพาราและพืชอื่นๆ 19 ชนิด จาก GeneBank โดยมีเลข Accession numbers ดังนี้ *Manihot esculenta*: *MeP5CS* (JQ807809.1) *Jatropha curcas*: *JcP5CS* (GU358610.1) *Boehmeria nivea*: *BnP5CS* (JN852975.1) *Prunus persica*: *PpP5CS* (KP973956.1) *Cucumis melo*: *CmP5CS* (JN590050.1) *Glycine max*: *GmP5CS*(AY492005.1) *Phaseolus vulgaris*: *PvP5CS* (EU340347.1) *Aegiceras comiculatum*: *AcP5CS* (DQ431113.1) *Eurya emarginata*: *EeP5CS* (KR363007.1) *Calotropis procera*: *CpP5CS* (KJ020750.1) *Nicotiana tabacum*: *NtP5CS* (HM854026.1) *Lycium chinense*: *LcP5CS* (KF771023.1) *Solanum lycopersicum*: *SIP5CS* (U60267.1) *Solanum torvum*: *StP5CS* (JN606861.1) *Eucalyptus camaldulensis*: *EcP5CS* (EU254744.3) *Lilium hybrid* division VII cultivar Sorbonne: *LhP5CS* (KU057356.1) *Musa acuminata* AAA Group: *MaAAAP5CS* (JN387126.1) *Oryza sativa* (japonica cultivar-group): *OsP5CS* (AY574031.1) *Triticum aestivum*: *TaP5CS* (KM523670.1) *Saccharum officinarum*: *SoP5CS* (EU005373.2) and *Sorghum bicolor*: *SbP5CS* (GQ377720.2)

#### 4.2 ศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* ของยางพาราภายใต้สภาวะขาดน้ำ

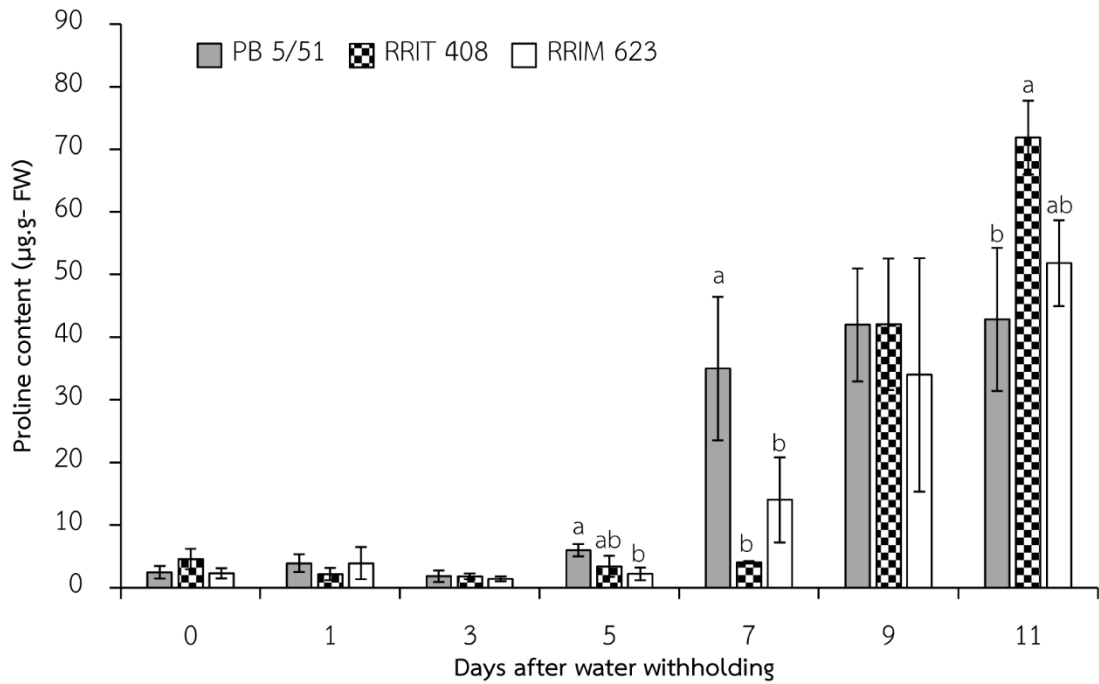
จากการศึกษาการตอบสนองทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาภายใต้สภาวะขาดน้ำ สามารถจำแนกยางพาราเป็นกลุ่มพันธุ์ที่มีแนวโน้มในการทนทาน และกลุ่มไวต่อสภาวะขาดน้ำ จึงนำตัวแทนของยางพาราแต่ละกลุ่มมาวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *P5CS* โดยยางพาราพันธุ์ PB 5/51 เป็นตัวแทนของยางพาราที่ไวต่อสภาวะขาดน้ำ และยางพาราพันธุ์ RRIT 408 และ RRIM 623 เป็นตัวแทนของยางพาราที่ทนทานต่อสภาวะขาดน้ำ โดยรดน้ำเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน วิเคราะห์ด้วยวิธี qRT-PCR ซึ่งจะแสดงถึงการทำงานของยีนที่แสดงออกในแต่ละช่วงของการขาดน้ำ และใช้ยีน 18S rRNA เป็นยีนเปรียบเทียบกับมาตรฐาน ผลการศึกษาพบว่า ยางพาราพันธุ์ RRIM 623 และ RRIT 408 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของยางพาราทนทานต่อสภาวะแล้ง มีระดับการแสดงออกของยีนลดลงในช่วงแรกที่เกิดการให้น้ำ จากนั้นมีระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มสูงขึ้น และสูงที่สุดหลังการรดให้น้ำเป็นเวลา 9 วัน และมีระดับการแสดงออกลดลงในวันที่ 11 (ภาพที่ 19) ส่วนยางพาราพันธุ์ PB 5/51 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของยางพาราไวต่อสภาวะแล้ง มีระดับการแสดงออกของยีน *P5CS* ลดต่ำลงเล็กน้อยหลังการให้น้ำ 1 วัน จากนั้นมีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นสูงสุดหลังการรดให้น้ำเป็นเวลา 3 วัน และลดต่ำลงหลังการให้น้ำ 5 7 9 และ 11 วันตามลำดับ ยางพารากลุ่มไวต่อสภาวะแล้งเกิดการตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำเร็วกว่ากลุ่มทนทานต่อสภาวะแล้ง เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการทนทานต่อสภาวะขาดน้ำน้อย เห็นได้จากการเกิดการดำเนินงานของยีน *P5CS* อย่างรวดเร็วหลังจากขาดน้ำ เพื่อสังเคราะห์โพรตีนไปช่วยในการรักษาสมดุลน้ำภายในเซลล์พืช เมื่อยางพาราไม่สามารถทนต่อสภาวะขาดน้ำได้ การแสดงออกของยีน *P5CS* จึงลดลงในที่สุด



ภาพที่ 19 ระดับการแสดงออกของยีน *P5CS* ของยางพาราพันธุ์ PB 5/51 RRIT 408 และ RRIM 623 ภายใต้สภาวะขาดน้ำเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P \leq 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD

#### 4.3 การวัดปริมาณโปรตีน

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *P5CS* และการสะสมโปรตีน จึงนำยางพาราพันธุ์ PB 5/51, RRIT 408 และ RRIM 623 ซึ่งใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน มาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วย วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากตัวอย่างใบยางพาราที่งดน้ำที่ระยะเวลาต่างกัน ได้แก่ 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน จากการวัดปริมาณโปรตีนในใบยางพาราทั้ง 3 พันธุ์ พบว่าในระยะแรกที่ยังงดการให้น้ำ ยางพาราทั้ง 3 พันธุ์มีปริมาณโปรตีนอยู่ในระดับต่ำ แต่เมื่อกดการให้น้ำ 7 วัน พบว่า ยางพาราพันธุ์ PB 5/51 มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยหลังขาดน้ำ 9 และ 11 วัน ส่วนยางพันธุ์ RRIM 623 และ RRIT 408 มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง หลังจากการงดน้ำ 7 วัน และมีปริมาณโปรตีนสูงสุดที่ 11 วัน (ภาพที่ 20)



ภาพที่ 20 ปริมาณโพรลีนของยางพาราพันธุ์ PB 5/51, RRIT 408 และ RRIM 623 ภายใต้สภาวะขาดน้ำเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P \leq 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD



## บทที่ 4

### วิจารณ์

#### 1. การตอบสนองทางด้านสรีรวิทยาของต้นกล้วยพาราภายใต้สภาวะขาดน้ำ

การปลูกพืชภายใต้โรงเรือนสามารถควบคุมสภาพแวดล้อมบางอย่างได้ เช่น ความเข้มแสง อุณหภูมิ ปริมาณน้ำ ซึ่งทำให้สามารถผลิตพืชที่มีคุณภาพ รวมทั้งกำหนดช่วงเวลาในการเก็บเกี่ยวพืชได้แน่นอน นอกจากนี้ยังพบว่า ภายใต้สภาวะโรงเรือนมีอุณหภูมิสูงกว่าภายนอกอีกด้วย (วันชัย และคณะ, 2550) ซึ่งการศึกษานี้มีปัจจัยเรื่องการให้น้ำเป็นปัจจัยสำคัญจึงมีการวางปลูกภายใต้สภาพโรงเรือนเพื่อควบคุมการให้น้ำ และยังสามารถควบคุมสภาพแวดล้อมของการทดลองนี้ได้เป็นอย่างดีทั้งปัจจัยของอุณหภูมิ และความชื้นที่พืชได้รับ แสดงให้เห็นว่า ต้นกล้วยพาราที่วางปลูกภายใต้โรงเรือนได้รับสภาพแวดล้อมที่เหมือนกัน ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเป็นผลจากการขาดน้ำของต้นกล้วยพารา การแสดงลักษณะอาการขาดน้ำทางสรีรวิทยาสามารถนำไปใช้ในการบ่งบอกถึงสภาวะขาดน้ำของพืช ในยางพาราพบอาการเหี่ยวของใบ ก้านใบ และยอด เมื่อระดับความชื้นดินที่วัดได้มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องหลังจากงดการให้น้ำ ซึ่งยางพาราพันธุ์ PB 5/51 เริ่มแสดงอาการเหี่ยวของใบเร็วที่สุดหลังการงดน้ำ 7 วัน มีอาการก้านใบเหี่ยว และยอดเหี่ยวเมื่อดน้ำเป็นเวลา 11 วัน ในขณะที่ยางพาราพันธุ์ RRIM 623 เพิ่งจะแสดงอาการใบเหี่ยวภายหลังการงดน้ำเป็นเวลา 9 วัน และมีการเปลี่ยนแปลงของการตอบสนองทางสรีรวิทยา และชีวโมเลกุลอื่นๆ ร่วมด้วย ยางพาราพันธุ์ที่แสดงอาการเหี่ยวช้าอาจมีแนวโน้มในการทนทานต่อสภาวะขาดน้ำ เช่นเดียวกับมันสำปะหลังพันธุ์ Nyalanda ซึ่งเป็นพันธุ์พื้นเมือง พบว่าเกิดอาการเหี่ยวของใบอย่างรุนแรงหลังความชื้นในดินลดลงเป็นเวลา 10 วัน เมื่อเทียบกับพันธุ์ MH96/0686 ซึ่งเป็นพันธุ์ปรับปรุง อาการที่พบได้แก่ ใบบริเวณปลายยอดมีสีเขียวซีด และใบล่างเสื่อมสภาพ นอกจากนี้ยังพบว่าพันธุ์ปรับปรุงยังมีค่าชักนำการเปิดปิดปากใบต่ำกว่า Nyalanda ถึงสองเท่าภายใต้สภาวะเครียด (Turyagyenda *et al.*, 2013) และในส้มแมนดาริน พบว่าต้นส้มมีอาการขาดน้ำโดยแสดงอาการขอบใบม้วน ใบเหลือง และร่วงจากต้น ซึ่งอาการที่พบมีความสัมพันธ์โดยตรงกับระดับความชื้นดิน (ปรียาภรณ์, 2550)

#### 2. การตอบสนองทางด้านสรีรวิทยาภายใต้สภาวะขาดน้ำ

การให้น้ำแก่พืชอย่างเต็มที่หรือจนดินอิมตัวรากพืชสามารถดึงน้ำไปใช้ได้จนกระทั่งถึงจุดที่พืชไม่สามารถดูดซับน้ำไว้ได้ พืชที่ได้รับสภาวะเครียดจากการขาดน้ำจะเกิดการตอบสนองทาง

สรีรวิทยาหลายๆ ด้านอย่างเห็นได้ชัด จากการทดลองพบว่า ปริมาณความชื้นในดินจากที่วัดได้ในวันที่ 0 มีความชื้นประมาณ 20% หลังจากงค่น้ำ 11 วันปริมาณความชื้นดินลดลงเหลือเพียง 5.7% เมื่อน้ำในดินลดลงปริมาณน้ำที่เข้าสู่ต้นพืชต่ำกว่าปริมาณน้ำที่ออกจากต้นพืช เห็นได้จากการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำในใบพืชลดลง ทำให้ส่วนต่างๆ ของต้นเกิดอาการเหี่ยว โดยเกิดขึ้นกับแผ่นใบ ก้านใบ ยอดและลำต้น ตามลำดับ เช่นเดียวกับยางพาราพันธุ์ GT1 ที่มีการเจริญเติบโตทางลำต้น โดยมีชั้นของใบ 2 ฉัตร เมื่อได้รับสภาวะแล้งโดยการให้น้ำเป็นเวลา 7 วัน ใบของยางพาราเริ่มแสดงอาการเหี่ยว และพบค่าปริมาณน้ำสัมพันธ์ในใบ ลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อระยะเวลาการขาดน้ำยาวนานขึ้น (Wang, 2014) นอกจากนี้ยังส่งผลให้เกิดการร่วงไหลของสารอิเล็กโทรไลต์เพิ่มมากขึ้น แสดงให้เห็นถึงความเสียหายของเซลล์พืชที่ได้รับผลกระทบจากการขาดน้ำ จากการทดลองต้นกล้ายางพาราพันธุ์ PB 5/51 เกิดการร่วงไหลของสารอิเล็กโทรไลต์มากกว่าพันธุ์อื่นๆ ซึ่งสัมพันธ์กับลักษณะอาการเหี่ยวของใบ เช่นเดียวกับข้าวในสภาวะขาดน้ำมีการร่วงไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ภายในราก และใบเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับต้นที่ได้รับน้ำปกติ ในทางกลับกันพบปริมาณรงควัตถุในใบลดลง (คงเอก, 2558) การร่วงไหลของสารอิเล็กโทรไลต์สามารถใช้พิจารณาถึงสภาพความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ของพืชที่ได้รับสภาวะขาดน้ำได้ เมื่อเซลล์เกิดความเสียหายนั้นรวมถึงคลอโรฟิลล์ซึ่งอยู่ภายในเซลล์ได้รับความเสียหายด้วยเช่นกัน ยางพาราทุกพันธุ์มีค่าปริมาณคลอโรฟิลล์สัมพันธ์ลดลงหลังจากได้รับสภาวะขาดน้ำเป็นเวลา 9 และ 11 วัน หลัาที่ขาดน้ำเป็นเวลา 18 วัน มีค่าปริมาณน้ำลดลงกว่า 20% พบปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลงอย่างมาก (Mohsenzadeh *et al.*, 2006) พืชที่อยู่ในสภาวะแล้งมีการลดลงของปริมาณน้ำในใบพืชเมื่อพืชขาดน้ำชักนำให้ปากใบพืชปิดลงเพื่อลดการสูญเสียน้ำ ส่งผลให้เกิดการจำกัดการดูดซึบคาร์บอนของพืช ทั้งยังส่งผลให้ศักยภาพในการสังเคราะห์แสงลดลงด้วย เนื่องจาก Photosystem II มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อสภาวะเครียดของพืชชั้นสูง คลอโรฟิลล์ฟลูออเรสเซนซ์เป็นวิธีการตรวจสอบการทำงานของ Photosystem II ได้ ดังนั้น คลอโรฟิลล์ฟลูออเรสเซนซ์สามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกพันธุ์พืชที่ทนทานต่อสภาวะเครียดจากสภาพแวดล้อมได้ (Baker and Rosenqvist, 2004) จากการทดลองพบว่า ค่าประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงของคลอโรฟิลล์ ของยางพาราที่วัดได้ในวันที่พืชได้รับน้ำปกติ มีค่า 0.58 - 0.63 และเมื่องคการให้น้ำอย่างต่อเนื่องมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ ในทุกพันธุ์ และช่วงสุดท้ายที่งดการให้น้ำเป็นเวลา 11 วัน ค่าประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงของคลอโรฟิลล์ลดลงมีค่าอยู่ที่ 0.08 - 0.23 แสดงให้เห็นว่าเมื่อยางพาราอยู่ในสภาวะขาดน้ำเป็นเวลานานประสิทธิภาพในการทนทานต่อสภาวะขาดน้ำลดลง ส่งผลให้ค่าประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงของคลอโรฟิลล์ในยางพาราลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งสอดคล้องกับค่าคลอโรฟิลล์สัมพันธ์ ผลที่ได้จากการศึกษาการตอบสนองทางสรีรวิทยาสามารถแบ่งกลุ่มยางพาราได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ทนทานต่อสภาวะแล้ง ประกอบด้วยยางพาราพันธุ์ RRIM 623 RRIT, 408 RRIM 600 และ RRIT 251 ส่วนกลุ่มที่ไวต่อสภาวะขาดน้ำ ประกอบด้วยยางพาราพันธุ์ PB 5/51 และ BPM 24

### 3. การแสดงออกของยีน *P5CS* และการสะสมโพรลีนภายใต้สภาวะขาดน้ำ

ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* และการสะสมโพรลีนภายใต้สภาวะขาดน้ำ ได้ทำการทดลองในยางพารา 3 พันธุ์ ที่มีความแตกต่างกันของระดับการทนแล้ง ได้แก่ ยางพาราพันธุ์ PB 5/51 เป็นพันธุ์ที่ไวต่อสภาวะขาดน้ำ พันธุ์ RRIT 408 และ RRIM 623 เป็นพันธุ์ที่ทนทานต่อสภาวะขาดน้ำ จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน pyrroline-5-carboxylate synthetase (*P5CS*) ของยางพาราบางส่วน พบมีลำดับนิวคลีโอไทด์ 2,182 นิวคลีโอไทด์ สามารถแปลงเป็นโปรตีนได้ 727 อะมิโนเอซิด จากการ BLAST-P พบตำแหน่ง AA\_kinase (Amino acid kinase family: Aspartokinase, Acetylglutamate kinase, Glutamate 5-kinase, Uridylate kinase และ Carbamate kinase) และ ALDH\_F18-19\_ProA-GPR (Gamma-glutamyl phosphate reductase (GPR), aldehyde dehydrogenase families 18 and 19) ของยีน *P5CS* เมื่อนำลำดับกรดอะมิโน *P5CS* ของยางพารา มาเปรียบเทียบกับพีชชนิดอื่นๆ พบว่าตำแหน่ง N-terminal Glutamate-5-kinase และ C-terminal glutamic- $\gamma$ -semialdehyde dehydrogenase (GSA-DH domains) เช่นเดียวกับยีน *P5CS* ที่พบในสับจ๋า (Zhuang *et al.*, 2011)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *P5CS* ของยางพารา ถูกนำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ เพื่อใช้ในการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *P5CS* ในต้นกล้ายางพารา 3 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำ เนื่องจากในช่วง 0 - 1 วันหลังการงดน้ำ ดินปลูกของต้นกล้ายางพาราทุกพันธุ์ยังคงมีความชื้นที่เพียงพอต่อการที่พืชนำไปใช้ได้ เห็นได้จากปริมาณน้ำในใบที่วัดได้ยังคงมีค่าไม่ต่างจากวันที่พืชได้รับน้ำปกติ พบว่า ยางพาราพันธุ์ RRIM 623 มีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเห็นได้ชัดหลังงดการให้น้ำเป็นเวลา 7 และ 9 วัน และลดลงในวันที่ 11 ส่วนยางพาราพันธุ์ RRIT 408 มีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด หลังงดการให้น้ำเป็นเวลา 9 วัน และลดลงในวันที่ 11 และยางพาราพันธุ์ PB 5/51 มีการแสดงออกของยีน *P5CS* เพิ่มสูงขึ้นหลังงดการให้น้ำเป็นเวลา 3 วัน และมีการแสดงออกของยีนลดลงเมื่อระยะเวลาการงดน้ำยาวนานขึ้น ยางพารากลุ่มไวต่อสภาวะแล้งเกิดการตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำเร็วกว่ากลุ่มทนทานต่อสภาวะแล้ง เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการทนทานต่อสภาวะขาดน้ำน้อย เห็นได้จากการเกิดการทำงานของยีน *P5CS* อย่างรวดเร็วหลังจากขาดน้ำ เพื่อสังเคราะห์โพรลีนไปช่วยในการรักษาสมดุลน้ำภายในเซลล์พืช เมื่อยางพาราไม่สามารถทนต่อสภาวะขาดน้ำได้ การแสดงออกของยีน *P5CS* จึงลดลงในที่สุด สอดคล้องกับการตรวจวัดการแสดงออกของยีน *P5CS* ในลิลลี่ พบระดับการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นเมื่อถูกชักนำให้เกิดสภาวะเครียด โดยเกลือ ความแห้งแล้ง และกรดแอบไซซิก นอกจากนี้ยังพบการสะสมโพรลีนในใบเพิ่มขึ้นด้วย (Wang *et al.*, 2017) ปริมาณโพรลีนในยางพาราที่วัดได้ในช่วง 0-3 วัน มีปริมาณน้อยไม่ต่างจากวันที่ได้รับน้ำปกติ เมื่อความชื้นในดินลดลงที่ 7 วันหลังการงดน้ำ พบว่า ในยางพาราพันธุ์ PB 5/51

มีปริมาณน้ำในใบพืชลดลง และมีการสะสมปริมาณโพรลีนเพิ่มขึ้นเช่นกัน สอดคล้องกับยางพาราพันธุ์ GT1 ที่พบการสะสมโพรลีนเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับปริมาณน้ำในพืชที่ลดลงจากภาวะเครียดแล้ง (Wang, 2014) ปริมาณโพรลีนถูกสร้างขึ้นตามปริมาณน้ำที่พืชได้รับ เมื่อเกิดการขาดแคลนน้ำในดินมากขึ้นปริมาณโพรลีนจะเพิ่มมากขึ้นด้วย (Sanier *et al.*, 2013) การรดน้ำกับต้นกล้ายางพารา 2 กลุ่ม ทั้งกลุ่มที่ทนทานต่อสภาวะขาดน้ำ และกลุ่มที่ไวต่อสภาวะขาดน้ำ ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน *P5CS* เกิดขึ้น ส่งผลให้ปริมาณโพรลีนที่พืชสะสมเพิ่มขึ้นตามมาภายหลังซึ่งเกิดขึ้นในต้นกล้ายางพาราทุกๆ พันธุ์

#### 4. ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองทางสรีรวิทยา การสะสมโพรลีน และการแสดงออกของยีน *P5CS* ภายใต้สภาวะขาดน้ำ

ความสัมพันธ์ด้านการตอบสนองทางสรีรวิทยา การสะสมโพรลีน และการแสดงออกของยีน *P5CS* พบว่า ลักษณะการตอบสนองทางสรีรวิทยาภายใต้สภาวะขาดน้ำชี้ให้เห็นถึงศักยภาพในการทนทานต่อสภาวะขาดน้ำของต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIM 623 ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก คือ มีอาการเหี่ยวของใบ และลำต้นเพียงเล็กน้อย อีกทั้งมีการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์น้อยกว่าพันธุ์อื่นๆ แสดงให้เห็นว่าเซลล์ยังคงมีความแข็งแรงหรือได้รับความเสียหายน้อย เช่นเดียวกับระดับการแสดงออกของยีน *P5CS* ในยางพาราพันธุ์ RRIM 623 ที่มีระดับการแสดงออกของยีน *P5CS* มากกว่าพันธุ์ RRIT 408 และ PB 5/51 ในทางกลับกัน RRIM 623 มีการสะสมโพรลีนน้อยกว่ายางพาราพันธุ์ RRIT 408 อาจเนื่องจากยางพาราพันธุ์ RRIM 623 มีกลไกอื่นที่สามารถบรรเทาภาวะเครียด และเกิดขึ้นไวกว่าการสะสมโพรลีน เช่นเดียวกับการทดลองที่ใช้ยางพาราพันธุ์ RRIM 623 เป็นต้นตอ เมื่อพืชอยู่ภายใต้สภาวะขาดน้ำพบลักษณะการหนีแล้ง (avoidance characteristics) โดยพืชแสดงการหยั่งรากลึกลงดินมากกว่าต้นที่อยู่ในสภาวะรับน้ำปกติ จึงทำให้ปริมาณโพรลีนที่ตรวจวัดได้มีปริมาณน้อย (Ahmad, 1999)

อย่างไรก็ตาม ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของยีน *P5CS* และปริมาณโพรลีนที่สะสมในใบยางพารา เป็นไปได้ว่าในกระบวนการสังเคราะห์โพรลีน นอกจากเอนไซม์ *P5CS* แล้วยังมีเอนไซม์ *P5CR* ที่ร่วมด้วย ยีน *P5CR* อาจเข้ามาเกี่ยวข้องในการตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำในยางพารา จากการศึกษาในข้าวสาลี พบการแสดงออกของยีน *P5CR* เพิ่มขึ้นเมื่อถูกชักนำให้เกิดสภาวะเครียดเกลือ แห้งแล้ง อุณหภูมิสูง และกรดแอมมิซิก นอกจากนี้ ยีน *P5CR* ยังมีผลต่อการปรับตัวในสภาวะเครียดของพืช การถ่ายโอนยีน *P5CR* เข้าสู่ *Arabidopsis* พบว่า พืชสะสมโพรลีนเพิ่มขึ้น สามารถเติบโตในดินที่มีความเข้มข้นเกลือสูงได้ดีกว่าต้นควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน (Ma *et al.*, 2008) ซึ่งมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาบทบาทของยีนนี้ต่อไป แต่การศึกษาครั้งนี้พบว่า

ยางพาราที่มีศักยภาพในการทนทานต่อสภาวะขาดน้ำ และยางพาราที่ไวต่อสภาวะขาดน้ำมีรูปแบบการแสดงออกของยีนที่ต่างกัน คือ ยางพาราที่ไวต่อสภาวะขาดน้ำ (PB 5/51) มีการแสดงออกของยีน *P5CS* เพิ่มขึ้นในช่วงแรก และลดลงอย่างรวดเร็วภายใต้สภาวะขาดน้ำ ในขณะที่กระบวนการดังกล่าวเกิดขึ้นช้ากว่าในพันธุ์ทนแล้ง (RRIM 623 และ RRIT 408)

## บทที่ 5

### สรุป

เมื่อพืชอยู่ในสภาวะขาดน้ำส่งผลให้เกิดกระบวนการต่างๆ ในพืชเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งเป็นการทำงานร่วมกันทั้งด้านสรีรวิทยา และด้านชีวโมเลกุล สำหรับยางพาราที่เกิดการขาดน้ำ มีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาอย่างเห็นได้ชัด โดยพืชเกิดอาการเหี่ยวของใบ ก้านใบ และยอด รวมถึงการตอบสนองทางสรีรวิทยา ได้แก่ มีปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบ ประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงของคลอโรฟิลล์ และปริมาณคลอโรฟิลล์สัมพัทธ์ลดลง การร่วงไหลของสารอเล็กโตรไลต์เพิ่มขึ้น จึงสามารถจำแนกพันธุ์ยางพาราที่มีศักยภาพในการทนทานต่อสภาวะขาดน้ำโดยอาศัยข้อมูลจากการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยา และด้านสรีรวิทยา ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ทนทานต่อสภาวะขาดน้ำประกอบด้วย ยางพาราพันธุ์ RRIM 623, RRIT 408, RRIM 600 และ RRIT 251 ส่วนกลุ่มที่ไวต่อสภาวะขาดน้ำประกอบด้วยยางพาราพันธุ์ PB 5/51 และ BPM 24 นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงของสารออสโมไลต์ในพืช ได้แก่ การสะสมปริมาณโพรลีนที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อพืชอยู่ในสภาวะขาดน้ำ ซึ่งเป็นสารที่พืชสร้างขึ้นเพื่อป้องกันความเสียหายที่เกิดขึ้นกับเซลล์พืชจากสภาวะขาดน้ำ ปริมาณโพรลีนที่สร้างขึ้นในยางพาราขึ้นอยู่กับความรุนแรงของการขาดน้ำ และความสามารถในการสร้างและสลายตัวของแต่ละพันธุ์ ปริมาณโพรลีนที่พืชสังเคราะห์ขึ้นเป็นผลมาจากการทำงานของยีน *P5CS* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์โพรลีนโดยพบว่า มีระดับการแสดงออกของยีน *P5CS* เพิ่มขึ้นเมื่อยางพาราอยู่ในสภาวะขาดน้ำ แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *P5CS* กับการสะสมโพรลีน อาจเนื่องจากกลไกการสะสมโพรลีนในยางพาราแต่ละพันธุ์มีความแตกต่างกัน หรืออาจมีเอนไซม์หลักอื่นๆ เช่น pyrroline-5-carboxylate reductase (*P5CR*) เข้ามาเกี่ยวข้องด้วย แต่พบว่ายางพาราที่มีศักยภาพในการทนทานต่อสภาวะขาดน้ำ และยางพาราที่ไวต่อสภาวะขาดน้ำมีรูปแบบการแสดงออกของยีน *P5CS* แตกต่างกัน จึงอาจนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการคัดเลือกพันธุ์ยางพาราทนแล้งได้ จากการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยา และชีวโมเลกุลที่เกิดขึ้น หลังจากชักนำให้ยางพาราอยู่ในสภาวะขาดน้ำ สามารถจำแนกยางพาราออกเป็นสองกลุ่มคือ ยางพารากลุ่มที่ทนทานต่อสภาวะแล้ง ได้แก่ พันธุ์ RRIM 623 และ RRIT 408 จะมีการตอบสนองทางด้านสรีรวิทยา การสะสมโพรลีน และการแสดงออกของยีนที่เกิดขึ้นช้ากว่ากลุ่มที่ไวต่อสภาวะแล้ง ได้แก่ PB 5/51

## เอกสารอ้างอิง

- กรณีการ ธีระวัฒนสุข และนภาพรรณ เลขะวิวัฒน์. 2554. “สถาบันวิจัยยาง 408” พันธุ์ยางใหม่ของสถาบันวิจัยยาง. วารสารยางพารา 6: 2-17.
- กลุ่มวิจัยและพัฒนาการอนุรักษ์ดินและน้ำบนพื้นที่พีชไร่. 2548. เอกสารวิชาการยางพารา. กรุงเทพฯ: กรมพัฒนาที่ดิน.
- คงเอก ศิริงาม. 2558. ผลของการขาดน้ำต่อการร่วไหลของสารอเล็กโทรไลต์ ปริมาณรงควัตถุ ปริมาณโพรงเส้น และการเจริญเติบโตของข้าว. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 2: 133-146.
- คณะกรรมการพัฒนาคุณภาพข้อมูลด้านการเกษตร. 2561. ยางพาราปี 2561. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. เข้าถึงได้จาก: <http://www.oae.go.th/download/forecastdata/situation/rubber.pdf> [เข้าถึงเมื่อ 29 มีนาคม 2561].
- เฉลิมพล แซมเพชร. 2535. สรีรวิทยาการผลิตพีชไร่. กรุงเทพฯ: โอ.เอส.พรีนติ้ง เฮ้าส์.
- ชวนพิศ แดงสวัสดิ์. 2554. สรีรวิทยาของพีช. กรุงเทพฯ: พัฒนาศึกษา.
- นวลมณี พรหมนิล. 2553. อัตราพันธุกรรมของความทนทานแล้งและร้อนในถั่วเขียว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นิตาชล แจ่มพรมมา, ประสิทธิ์ ใจศิลป์, พัชริน ส่งศรี, ประสาร สวัสดิ์ชิตัง, ศักดา ดาดวง และสมปอง ธรรมศิริรักษ์. 2555. การประเมินการร่วไหลของสารอเล็กโทรไลต์ และระดับมาลอนไดแอลดีไฮด์ของใบอ้อย 10 สายพันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำ. วารสารแก่นเกษตร 40: 74-82.
- ประวีตร โสภโณดร. 2556. บทปฏิบัติการเรื่อง ยางพารา. เข้าถึงได้จาก: <http://www.natres.psu.ac.th/Department/PlantScience/510-211/> [เข้าถึงเมื่อ 1 มิถุนายน 2561].
- ปรียาภรณ์ ต่อวงศ์. 2550. สภาวะความเครียดของน้ำที่มีผลต่อสัณฐานวิทยาและการเกิดตาดอกส้มพันธุ์ฮันนี่เมอร์คอร์ทแทนกอร์และมินเนโอลาแทนเจล. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วันชัย คุปวานิชพงษ์, นาวิ จิระชีวี, วุฒิพล จันทร์สระคู และวิโรจน์ โทราศาสตร์. 2550. โครงการศึกษาประสิทธิภาพโรงเรือนพีชปลูก. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร.
- วาสนา ไทยถาวร และเรวัตติ เลิศฤทัยโยธิน. 2555. การทดสอบปริมาณโพรงเส้นในอ้อยภายใต้สภาพเค็ม. การประชุมวิชาการแห่งชาติ ครั้งที่ 9 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน หน้า 2248-2253.
- ศยามล แก้วบรรจง. 2558. ศึกษาวิธีเก็บรักษาละอองเกสรตัวผู้ยางพาราในไนโตรเจนเหลว. วารสารยางพารา 36: 13-18.

- ศุภมิตร ลิ้มปิชัย. 2554. ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของยางพันธุ์สถาบันวิจัยยาง 408 (RRIT 408). วารสารยางพารา 6: 18-22.
- ศูนย์พยากรณ์เศรษฐกิจและธุรกิจ. 2558. ผลกระทบภัยแล้ง. เข้าถึงได้จาก: [http://cebf.utcc.ac.th/upload/analysis\\_file/file\\_th\\_202d06y2015.pdf](http://cebf.utcc.ac.th/upload/analysis_file/file_th_202d06y2015.pdf) [เข้าถึงเมื่อ 29 มีนาคม 2561].
- สถาบันวิจัยยาง. 2554. คำแนะนำพันธุ์ยาง ปี 2554. วารสารยางพารา 32: 4-34.
- สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. 2544. สรีรวิทยาของพืช. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ส่วนการใช้น้ำชลประทาน สำนักอุทกวิทยาและบริหารน้ำ. 2554. คู่มือการหาปริมาณการใช้น้ำของพืชปริมาณการใช้น้ำของพืชอ้างอิงและค่าสัมประสิทธิ์พืช. กรมชลประทาน. เข้าถึงได้จาก: [http://water.rid.go.th/hwm/cropwater/iwmd/pdf/rev\\_cwr\\_manual.pdf](http://water.rid.go.th/hwm/cropwater/iwmd/pdf/rev_cwr_manual.pdf) [เข้าถึงเมื่อ 20 กรกฎาคม 2559].
- สายันท์ สดุดี และอัครมน ลิ้มสกุล. 2558. ภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลงกระทบต่อยางพาราในภาคใต้. เข้าถึงได้จาก: <http://www.p2s.psu.ac.th/index.php/rum/2014-09-09-03-44-51> [เข้าถึงเมื่อ 27 สิงหาคม 2559].
- สายันท์ สดุดี. 2537. สภาพะชาตน้ำในการผลิตพืช. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร. 2559. คลังข้อมูลสารสนเทศระดับภูมิภาค. เข้าถึงได้จาก: <http://www.arda.or.th/kasetinfo/south/para/controller/01-04-02.php> [เข้าถึงเมื่อ 8 สิงหาคม 2559].
- อินทิรา ขุดแก้ว. 2560. ความเครียดของพืช (plant stress). เข้าถึงได้จาก: <http://biology.ipst.ac.th/?p=3361> [เข้าถึงเมื่อ 21 พฤษภาคม 2561].
- อุไรวรรณ ทองแกมแก้ว. 2561. บทที่ 1 หลักการขยายพันธุ์พืชแบบไม่อาศัยเพศ. เข้าถึงได้จาก: [https://www.tcd.tsu.ac.th/ps/page\\_detial\\_menu.php?idm=10&mid=243](https://www.tcd.tsu.ac.th/ps/page_detial_menu.php?idm=10&mid=243) [เข้าถึงเมื่อ 31 พฤษภาคม 2561].
- เอ็จ สโรบล. 2554. Mechanisms of plant responses to global climate change. วารสารแก่นเกษตร 39: 22-26.
- Ahmad, B. 1999. Effect of rootstock on growth and water use efficiency of *Hevea* during water stress. *Journal of Rubber Research* 2: 99-119.
- Baker, N.R and E. Rosenqvist. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany* 55: 1607–1621.



- Bates, L.S., R.P. Waldren and I.D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39: 205-207.
- Bogges, S.F., C.R. Stewart, D. Aspinall and L.G. Peleg. 1976. Effect of water stress on proline synthesis from radioactive precursors. *Plant Physiology* 58: 398-401.
- Fathi, A. and D.B. Tari. 2016. Effect of drought stress and its mechanism in plants. *International Journal of Life Sciences* 10: 1-6.
- Gireesh, T., Y.A. Varghese, K.E. Woeste, V.C. Mercykutty and J.G. Marattukalam. 2012. Effect of monoclonal and assorted seedling rootstocks on long term growth and yield of *Hevea* clones. *Silvae Genetica* 1: 52-57.
- Gzik, A. 1996. Accumulation of proline and pattern of amino acids in sugar beet plants in response to osmotic, water and salt stress. *Environmental and Experimental Botany* 36: 29-38.
- Karpinski, S., C. Escobar, B. Kapinska, G. Creissen and P.M. Mullineaux. 1997. Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light stress. *Plant Cell* 9: 627-640.
- Kaur, G. and B. Asthir. 2015. Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. *Biologia Plantarum* 59: 609-619.
- Kocsis, L. and Z. Varga. 2009. Introduction of a lime and drought tolerant rootstock variety. *Acta Horticulturae* 827: 465-469.
- Kunjet, S., P. Thaler, F. Gay, P. Chuntuma, K. Sangkhasila and P. Kasemsap. 2013. Effects of drought and tapping for latex production on water relations of *Hevea brasiliensis* trees. *Kasetsart Journal (Natural Science)* 47: 506-515.
- Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25: 402-408.
- Ma, L., E. Zhou, L. Gao, X. Mao, R. Zhou and J. Jia. 2008. Isolation, expression analysis and chromosomal location of *P5CR* gene in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *South African Journal of Botany* 74: 705-712.
- Mafakheri, A., A. Siosemardeh, B. Bahramnejad, P.C. Struik and Y. Sohrabi. 2010. Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. *Australian Journal of Crop Science* 4: 580-585.

- Mohsenzadeh, S., M.A. Malboobi, K. Razavi and A.S. Farrahi. 2006. Physiological and molecular responses of *Aeluropus lagopoides* (Poaceae) to water deficit. *Environmental and Experimental Botany* 56: 314-322.
- Nascimento, E.S.P., C.R. Oliveira, P.S. Gonçalves, R.B. Costa, R.M.B. Moreno, L.H.C. Mattoso and A.G. Ferreira. 2011. Effect of rootstock on the scion of *Hevea brasiliensis* through metabolic analysis of latex samples by <sup>1</sup>H NMR. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 1: 82-88.
- Osakabe, Y., K. Osakabe, K. Shinozaki and L.P. Tran. 2014. Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant Science* 5: 1-9.
- RBC Bioscience. 2018. RBC TA Cloning Vector Kit. Available: <https://www.rbcbioscience.com/> [accessed on June 20, 2018].
- Sairam, R.K. and A. Tyagi. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science* 86: 407-421.
- Sanier, C., G. Oliver, A. Clement-vidal, D. Fabre, L. Lardet and P. Montoro. 2013. Influence of Water Deficit on the Physiological and Biochemical Parameters of *in vitro* Plants from *Hevea brasiliensis* Clone PB 260. *Journal of Rubber Research* 16: 61-74.
- Sapeta, H., J.M. Costa, T. Lourenc, J. Maroco, P. Linde and M.M. Oliveira. 2013. Drought stress response in *Jatropha curcas*: Growth and physiology. *Environmental and Experimental Botany* 85: 76-84.
- Szabados, L. and A. Saviouré. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15: 89-97.
- Turyagyenda, L.F., E.B. Kizito, M. Ferguson, Y. Baguma, M. Agaba, J.J.W. Harvey and D.S.O. Osiru. 2013. Physiological and molecular characterization of drought responses and identification of candidate tolerance genes in cassava. *Annals of Botany Plants* 5: 1-17.
- Verslues, P.E and S. Sharma. 2010. Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *The Arabidopsis Book* 8: 1-23.
- Wang, L. 2014. Physiological and molecular responses to drought stress in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *Plant Physiology and Biochemistry* 83: 243-249.

- Wang, L., Z. Guo, Y. Zhang, Y. Wang, G. Yang, L. Yang, R. Wang and Z. Xie. 2017. Characterization of *LhSorP5CS*, a gene catalyzing proline synthesis in Oriental hybrid lily Sorbonne: molecular modelling and expression analysis. *Botanical Studies* 58: 1-8.
- Yoshida, Y., T. Kiyosue, T. Katagiri, H. Ueda, T. Mizoguchi, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Wada, Y. Harada and K. Shinozaki, 1995. Correlation between the induction of a gene for delta-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Plant Journal* 7: 751–760.
- Zhuang, G., B. Li, H. Guo, J. Liu and F. Chen. 2011. Molecular cloning and characterization of *P5CS* gene from *Jatropha curcas* L. *African Journal of Biotechnology* 10: 14803-14811.

## ภาคผนวก

### ข้อมูลและลักษณะที่สำคัญของยางพาราพันธุ์แนะนำที่ได้

#### ยางพาราพันธุ์ RRIT 251

- พ่อ - แม่พันธุ์ ได้จากต้นกล้าจากแปลงเอกชนในจังหวัดสงขลา
- ลักษณะประจำพันธุ์ รูปร่างป้อมปลายใบ ขอบใบเป็นคลื่น ใบมีสีเขียว ฉัตรมีขนาดใหญ่เป็นรูปกรวย ในช่วงยางอ่อนแตกกิ่งมาก พุ่มใบทึบมีขนาดใหญ่เป็นรูปทรงกลม เริ่มผลัดใบค่อนข้างช้า
- ลักษณะทางการเกษตร ขนาดลำต้นทั้งแปลงสม่ำเสมอ จำนวนต้นเปิดกรีดได้มาก เปลือกเดิมและเปลือกอกใหม่หนาปานกลาง มีจำนวนต้นเปลือกแห้งน้อยต้านทานโรคใบร่วง โรคราแป้ง โรคใบจุดนูน และโรคราสีชมพูระดับปานกลาง ต้านทานโรคเส้นดำระดับดี ผลผลิตเนื้อยาง 10 ปี กรีด เฉลี่ย 462 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี
- ลักษณะดีเด่น ผลผลิตเนื้อยางสูงมาก มีจำนวนต้นเปิดกรีดได้มาก ความต้านทานโรคเส้นดำในระดับดี มีจำนวนต้นเปลือกแห้งน้อย
- ข้อจำกัด / ข้อควรระวัง ในระยะยางอ่อน ต้นยางที่ปลูกทั้งแปลงกิ่งตาและแปลงปลูกในพื้นที่ฝนตกชุกหรือพื้นที่ที่มีความชื้นสูง ยางพันธุ์นี้อ่อนแอต่อโรคใบจุดนูน ใบจุดคอลเลโทตริกัมมาก
- พื้นที่แนะนำ ปลูกได้ในพื้นที่ทั่วไป ยกเว้น พื้นที่ลาดชัน พื้นที่ที่มีหน้าดินตื้น พื้นที่ที่มีระดับน้ำใต้ดินสูง และพื้นที่ลมแรงเนื่องจากทรงพุ่มมีขนาดใหญ่ แตกกิ่งไม่สมดุล

#### ยางพาราพันธุ์ RRIM 600

- พ่อ - แม่พันธุ์ PB 86 x Tjir
- ลักษณะประจำพันธุ์ ใบมีรูปร่างป้อมปลายใบ สีเขียวอมเหลือง ฉัตรใบเป็นรูปกรวยขนาดเล็ก ในระยะ 2 ปีแรกลำต้นจะตั้งตรง การแตกกิ่งช้า การแตกกิ่งเป็นมุมแหลมค่อนข้างยาว ทรงพุ่มมีขนาดปานกลางเป็นรูปพัด เริ่มผลัดใบเร็ว
- ลักษณะทางการเกษตร ในระยะก่อนเปิดกรีดและระหว่างกรีดการเจริญเติบโตปานกลาง เปลือกเดิมบาง เปลือกอกใหม่หนาปานกลาง ผลผลิตระยะแรกปานกลางแต่จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในปีต่อมา ให้ผลผลิตเนื้อยาง 10 ปีกรีด เฉลี่ย 297 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี มีจำนวนต้นเปลือกแห้งน้อย

อ่อนแอต่อโรคไฟทอปธอรา โรคราสีชมพู โรคใบร่วง ใบจุดก้ำปลาและโรคเส้นดำ ต้านทานโรคราแป้ง และใบจุดนูนในระดับปานกลาง

- ลักษณะดีเด่น การปรับตัวและให้ผลผลิตได้ดีในเกือบทุกพื้นที่ ทนทานต่อการกรีด  
ถี่ได้มากกว่าพันธุ์อื่นๆ และมีจำนวนต้นเปลือกแห้งน้อย

- ข้อจำกัด / ข้อควรระวัง อ่อนแอมากต่อโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อไฟทอปธอรา โรค  
เส้นดำ และโรคราสีชมพู เปลือกเดิมบาง

- พื้นที่แนะนำ ปลูกได้ในพื้นที่ทั่วไป พื้นที่ลาดชัน ยกเว้น พื้นที่ที่มีฝนตกชุกเนื่องจาก  
ค่อนข้างอ่อนแอต่อโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อไฟทอปธอรา โรคเส้นดำและโรคราสีชมพู (กลุ่มวิจัยและ  
พัฒนาการอนุรักษ์ดินและน้ำบนพื้นที่พีซีไร, 2548)

### ยางพาราพันธุ์ RRIT 408

- พ่อ - แม่พันธุ์ RRIC 101 x PB 5/51

- ลักษณะประจำพันธุ์ รูปร่างใบกลางป้อมค่อนข้างปลายใบ สีเขียวอมเหลือง ผิว  
ใบเป็นมัน แผ่นใบขรุขระ ขอบใบเรียบ ปลายใบเป็นติ่งแหลม มีเปลือกต้นหนา จำนวนวงท่อน้ำยาง  
มาก รูปทรงลำต้นตรง ลักษณะกลม การแตกกิ่งสมดุลงามในระดับสูง ทำให้สามารถแนะนำให้ปลูกได้ใน  
พื้นที่ที่มีข้อจำกัด เช่น ลาดชัน มีระดับน้ำใต้ดินสูง (ศุภมิตร, 2554)

- ลักษณะทางการเกษตร การเจริญเติบโตระยะก่อนเปิดกรีดดี ทำให้เปิดกรีดได้เร็ว  
ให้ผลผลิตต่อต้นสูง และมีขนาดลำต้นสม่ำเสมอที่ดี ทำให้มีจำนวนต้นกรีดมาก ให้ผลผลิตเฉลี่ย  
ระหว่าง 216.6 – 352.4 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี ให้ผลผลิตเนื้อยางแห้งสูงมาก

- ลักษณะดีเด่น ผลผลิตเนื้อยางสูง มีจำนวนต้นเปิดกรีดได้มาก ต้านทานต่อโรคใบ  
ร่วงที่เกิดจากเชื้อราไฟทอปธอราและใบจุดก้ำปลาในระดับดี ต้านทานต่อโรคราแป้ง เส้นดำและราสี  
ชมพูในระดับปานกลาง

- ข้อจำกัด / ข้อควรระวัง ไม่เหมาะสมกับระบบกรีดที่มีจำนวนวันกรีดมากเพราะต้น  
ยางจะเกิดอาการเปลือกแห้งได้ง่าย (กรรณิการ์ และนภาพรรณ, 2554)

- พื้นที่แนะนำ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่  
ที่มักปรากฏสภาพแห้งแล้ง เนื่องจากเป็นพันธุ์อย่างที่ยืดหยุ่นทนต่อสภาพดังกล่าวได้ดี ทั้งยังให้ผลผลิต  
และลักษณะตามที่ต้องการ

## ยางพาราพันธุ์ BPM 24

- พ่อ - แม่พันธุ์ AVROS 1734 x GT 1
- ลักษณะประจำพันธุ์ ใบมีรูปร่างป้อมกลางใบ สีเขียว ลักษณะลำต้นตรงมีเปลือกต้นหนา ยางอ่อน กิ่งมีขนาดปานกลาง แตกกิ่งมาก พุ่มทึบเป็นทรงกรวย เมื่ออายุมากมีการทิ้งกิ่งมาก ผลัดใบเร็ว
- ลักษณะทางการเกษตร การเจริญเติบโตระยะก่อนเปิดกรีดดี อายุ 1-2 ปี จะแตกกิ่งเล็กๆ จำนวนมาก และก่อนเปิดกรีดบริเวณลำต้นและกิ่งมีน้ำยางไหลซึ่งจะหายในเวลาต่อมา ให้ผลผลิตเฉลี่ยระหว่าง 344 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี ให้ผลผลิตเนื้อยางแห้งสูงมาก
- ลักษณะดีเด่น ผลผลิตเนื้อยางสูง ต้านทานต่อโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อราไฟทอปธอราใบจุดก้างปลาและเส้นดำในระดับดี ต้านทานในระดับปานกลางต่อโรคราแป้ง ใบจุดคอเลโทตริกัมและราสีชมพู
- ข้อจำกัด / ข้อควรระวัง ไม่เหมาะสมกับระบบกรีดที่มีจำนวนวันกรีดมากเพราะต้นยางจะเกิดอาการเปลือกแห้งได้ง่าย
- พื้นที่แนะนำ ปลูกได้ในพื้นที่ทั่วไป พื้นที่ลาดชัน พื้นที่ที่มีความชื้นสูง พื้นที่ที่มีหน้าดินตื้น พื้นที่ที่มีระดับน้ำใต้ดินสูง (สถาบันวิจัยยาง, 2554)

### ตารางภาคผนวกที่ 1 ชื่อพันธุ์ และสถานที่เก็บเมล็ดพันธุ์ยางพาราที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อพันธุ์	สถานที่เก็บเมล็ดพันธุ์
PB 5/51	จ.สุราษฎร์ธานี
RRIT 251	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8 จังหวัดสงขลา
RRIM 623	อ.กันตัง จ.ตรัง
RRIM 600	จ.สุราษฎร์ธานี
RRIT 408	จ.สุราษฎร์ธานี
BPM 24	อ.กันตัง จ.ตรัง

ตารางภาคผนวกที่ 2 ระดับการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยาของยางพาราที่ 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน หลังการให้น้ำ

	ระดับความเหี่ยวของยางพารา						
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7	วันที่ 9	วันที่ 11
PB 5/51	1.00a	1.00a	1.00a	1.33a	3.33a	3.33a	4.67a
RRIT 408	1.00a	1.00a	1.00a	1.00a	1.67bc	3.00a	4.33ab
RRIM 623	1.00a	1.00a	1.00a	1.00a	1.33bc	2.00a	3.00b
RRIM 600	1.00a	1.00a	1.00a	1.00a	1.00c	2.67a	3.67ab
BPM24	1.00a	1.00a	1.00a	1.33a	2.67ab	2.67a	4.33ab
RRIT 251	1.00a	1.00a	1.00a	1.00a	1.33bc	2.00a	4.67a
F-test	ns	ns	ns	ns	*	ns	*
% C.V.	0.00	0.00	0	30	41.39	34.96	21.45

\* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P=0.05)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD

ตารางภาคผนวกที่ 3 ปริมาณน้ำในสัมพันธ์ใบของยางพาราที่ 0 1 3 5 7 9 และ 11 วัน หลังการให้น้ำ

	ปริมาณน้ำในใบ (%)						
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7	วันที่ 9	วันที่ 11
PB5/51	89.77 <sup>a</sup>	81.06 <sup>a</sup>	78.98 <sup>a</sup>	84.56 <sup>a</sup>	63.15 <sup>b</sup>	23.98 <sup>c</sup>	20.18 <sup>a</sup>
RRIT408	89.76 <sup>a</sup>	79.31 <sup>a</sup>	89.81 <sup>a</sup>	85.88 <sup>a</sup>	78.65 <sup>ab</sup>	62.14 <sup>ab</sup>	29.05 <sup>a</sup>
RRIM623	86.25 <sup>a</sup>	82.32 <sup>a</sup>	85.26 <sup>a</sup>	79.08 <sup>a</sup>	85.19 <sup>ab</sup>	76.70 <sup>a</sup>	23.71 <sup>a</sup>
RRIM600	92.15 <sup>a</sup>	80.35 <sup>a</sup>	81.02 <sup>a</sup>	85.15 <sup>a</sup>	87.84 <sup>a</sup>	79.79 <sup>a</sup>	20.96 <sup>a</sup>
BPM24	90.44 <sup>a</sup>	84.97 <sup>a</sup>	83.28 <sup>a</sup>	87.84 <sup>a</sup>	84.97 <sup>ab</sup>	34.96 <sup>bc</sup>	24.94 <sup>a</sup>
RRIT251	94.95 <sup>a</sup>	81.57 <sup>a</sup>	90.45 <sup>a</sup>	83.08 <sup>a</sup>	90.06 <sup>a</sup>	88.38 <sup>a</sup>	32.57 <sup>a</sup>
F-test	ns	ns	ns	ns	*	*	ns
% C.V.	3.80	14.24	8.67	34.19	14.30	22.56	31.43

\* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD

ตารางภาคผนวกที่ 4 การร่วงไหลของสารอเล็กโทรไลต์ ของยางพาราที่ 0 1 3 5 7 9 และ 11 วัน หลังงดการให้น้ำ

	การร่วงไหลของสารอเล็กโทรไลต์ (%)						
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7	วันที่ 9	วันที่ 11
PB5/51	6.39 <sup>a</sup>	8.30 <sup>a</sup>	12.20 <sup>a</sup>	11.04 <sup>a</sup>	17.33 <sup>a</sup>	33.09 <sup>a</sup>	36.81 <sup>a</sup>
RRIT408	5.26 <sup>a</sup>	7.91 <sup>a</sup>	11.52 <sup>a</sup>	10.71 <sup>a</sup>	13.49 <sup>ab</sup>	16.20 <sup>ab</sup>	34.04 <sup>a</sup>
RRIM623	6.04 <sup>a</sup>	8.08 <sup>a</sup>	13.69 <sup>a</sup>	11.19 <sup>a</sup>	12.22 <sup>b</sup>	12.39 <sup>b</sup>	32.04 <sup>a</sup>
RRIM600	6.54 <sup>a</sup>	7.47 <sup>a</sup>	13.90 <sup>a</sup>	11.96 <sup>a</sup>	13.75 <sup>ab</sup>	21.87 <sup>ab</sup>	32.86 <sup>a</sup>
BPM24	6.24 <sup>a</sup>	8.71 <sup>a</sup>	12.81 <sup>a</sup>	10.42 <sup>a</sup>	14.13 <sup>ab</sup>	27.88 <sup>ab</sup>	38.97 <sup>a</sup>
RRIT251	6.08 <sup>a</sup>	7.86 <sup>a</sup>	11.48 <sup>a</sup>	12.17 <sup>a</sup>	12.13 <sup>b</sup>	22.16 <sup>ab</sup>	32.63 <sup>a</sup>
F-test	ns	ns	ns	ns	*	*	ns
% C.V.	16.42	59.33	15.07	14.68	17.43	36.09	30.07

\* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P \leq 0.05$ )

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD

ตารางภาคผนวกที่ 5 ประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงของคลอโรฟิลล์ ของยางพาราที่ 0 1 3 5 7 9 และ 11 วัน หลังงดการให้น้ำ

	ประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงของคลอโรฟิลล์						
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7	วันที่ 9	วันที่ 11
PB5/51	0.62 <sup>a</sup>	0.64 <sup>a</sup>	0.58 <sup>ab</sup>	0.55 <sup>ab</sup>	0.58 <sup>a</sup>	0.45 <sup>a</sup>	0.06 <sup>a</sup>
RRIT408	0.60 <sup>a</sup>	0.55 <sup>ab</sup>	0.49 <sup>b</sup>	0.41 <sup>b</sup>	0.54 <sup>a</sup>	0.47 <sup>a</sup>	0.10 <sup>a</sup>
RRIM623	0.62 <sup>a</sup>	0.52 <sup>b</sup>	0.57 <sup>ab</sup>	0.50 <sup>ab</sup>	0.50 <sup>a</sup>	0.54 <sup>a</sup>	0.11 <sup>a</sup>
RRIM600	0.62 <sup>a</sup>	0.61 <sup>ab</sup>	0.66 <sup>a</sup>	0.56 <sup>a</sup>	0.56 <sup>a</sup>	0.46 <sup>a</sup>	0.10 <sup>a</sup>
BPM24	0.61 <sup>a</sup>	0.57 <sup>ab</sup>	0.51 <sup>ab</sup>	0.47 <sup>ab</sup>	0.51 <sup>a</sup>	0.42 <sup>a</sup>	0.08 <sup>a</sup>
RRIT251	0.58 <sup>a</sup>	0.65 <sup>a</sup>	0.56 <sup>ab</sup>	0.45 <sup>ab</sup>	0.51 <sup>a</sup>	0.50 <sup>a</sup>	0.12 <sup>a</sup>
F-test	ns	*	*	*	ns	ns	ns
% C.V.	8.45	6.94	11.63	12.12	13.49	15.81	77.88

\* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P \leq 0.05$ )

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD



ตารางภาคผนวกที่ 6 ปริมาณคลอโรฟิลล์สัมพันธ์ของยางพาราที่ 0 1 3 5 7 9 และ 11 วัน หลังงดการให้น้ำ

	ปริมาณคลอโรฟิลล์สัมพันธ์						
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7	วันที่ 9	วันที่ 11
PB 5/51	73.60 <sup>a</sup>	75.79 <sup>a</sup>	75.66 <sup>a</sup>	76.61 <sup>a</sup>	77.04 <sup>a</sup>	74.74 <sup>a</sup>	68.32 <sup>a</sup>
RRIT 408	70.75 <sup>ab</sup>	70.79 <sup>ab</sup>	71.79 <sup>ab</sup>	70.69 <sup>ab</sup>	70.66 <sup>ab</sup>	64.18 <sup>b</sup>	61.17 <sup>bc</sup>
RRIM 623	72.51 <sup>ab</sup>	67.77 <sup>ab</sup>	70.75 <sup>ab</sup>	73.22 <sup>ab</sup>	71.45 <sup>ab</sup>	68.07 <sup>ab</sup>	62.64 <sup>b</sup>
RRIM 600	65.59 <sup>ab</sup>	63.34 <sup>b</sup>	68.11 <sup>b</sup>	66.66 <sup>b</sup>	66.56 <sup>b</sup>	63.59 <sup>b</sup>	58.19 <sup>bc</sup>
BPM24	70.95 <sup>ab</sup>	68.04 <sup>ab</sup>	70.13 <sup>ab</sup>	70.83 <sup>ab</sup>	71.81 <sup>ab</sup>	65.98 <sup>b</sup>	57.14 <sup>c</sup>
RRIT 251	63.96 <sup>b</sup>	65.78 <sup>b</sup>	66.75 <sup>b</sup>	66.74 <sup>b</sup>	66.27 <sup>b</sup>	62.65 <sup>b</sup>	51.26 <sup>d</sup>
F-test	*	*	*	*	*	*	*
% C.V.	7.35	53.65	40.66	36.62	43.65	32.06	14.64

\* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P \leq 0.05$ )

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในระดับเดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD

ตารางภาคผนวกที่ 7 ระดับการแสดงออกของยีน P5CS ของยางพาราที่ 0 1 3 5 7 9 และ 11 วัน หลังงดการให้น้ำ

	ระดับการแสดงออกของยีน P5CS						
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7	วันที่ 9	วันที่ 11
PB 5/51	1.00 <sup>a</sup>	0.95 <sup>a</sup>	3.56 <sup>a</sup>	1.30 <sup>a</sup>	0.79 <sup>a</sup>	1.02 <sup>b</sup>	0.56 <sup>b</sup>
RRIT 408	1.00 <sup>a</sup>	0.24 <sup>a</sup>	0.55 <sup>b</sup>	0.31 <sup>b</sup>	1.36 <sup>a</sup>	4.80 <sup>a</sup>	1.40 <sup>ab</sup>
RRIM 623	1.00 <sup>a</sup>	1.27 <sup>a</sup>	1.29 <sup>b</sup>	0.42 <sup>b</sup>	2.03 <sup>a</sup>	5.40 <sup>a</sup>	2.70 <sup>a</sup>
F-test	ns	ns	*	*	ns	ns	*
% C.V.	0	90.63	61.38	25.68	37.83	34.96	37.57

\* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P \leq 0.05$ )

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในระดับเดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD

ตารางภาคผนวกที่ 8 ปริมาณโพรลินของยางพาราที่ 0 1 3 5 7 9 และ 11 วัน หลังดการให้น้ำ

	ปริมาณโพรลิน						
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7	วันที่ 9	วันที่ 11
PB5/51	2.44 <sup>a</sup>	3.90 <sup>a</sup>	1.81 <sup>a</sup>	5.97 <sup>a</sup>	34.99 <sup>a</sup>	41.96 <sup>a</sup>	42.83 <sup>b</sup>
RRIT408	4.55 <sup>a</sup>	2.17 <sup>a</sup>	1.79 <sup>a</sup>	3.41 <sup>ab</sup>	4.044 <sup>b</sup>	42.07 <sup>a</sup>	71.88 <sup>a</sup>
RRIM623	2.30 <sup>a</sup>	3.90 <sup>a</sup>	1.38 <sup>a</sup>	2.21 <sup>b</sup>	14.02 <sup>b</sup>	33.98 <sup>a</sup>	51.83 <sup>ab</sup>
F-test	ns	ns	ns	*	*	ns	*
% C.V.	2.57	2.45	2.57	2.57	2.78	2.78	2.78

\* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P \leq 0.05$ )

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในสตมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD

