



การศึกษาการแสดงออกของยีน *NCED* ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสะสมกรดแอบไซซิก  
ในสภาวะขาดน้ำของต้นกล้ายางพารา

Study of *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED)* Gene Expression  
Involved in ABA Accumulation during Water Deficit Condition  
in Rubber Tree Seedlings

ชุตินา สุทจิตร  
Chutima Sutjit

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

2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การศึกษาการแสดงออกของยีน *NCED* ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสะสมกรดแอบไซซิก  
ในสภาวะขาดน้ำของต้นกล้ายางพารา

Study of *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED)* Gene Expression  
Involved in ABA Accumulation during Water Deficit Condition  
in Rubber Tree Seedlings

ชุตินา สุทจิตร

Chutima Sutjit

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

2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**ชื่อวิทยานิพนธ์** การศึกษาการแสดงผลของยื่น *NCED* ที่เกี่ยวข้องกับภาระสมรรถนะวิชาชีพ  
ในสภาวะขาดน้ำของต้นกล้วยพารา  
**ผู้เขียน** นางสาวชุติมา สุทธิจิตร  
**สาขาวิชา** พืชศาสตร์

---

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	คณะกรรมการสอบ
..... (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กรกช นาคคนอง)	.....ประธานกรรมการ (รองศาสตราจารย์ ดร.สายัณห์ สดุดี)
<b>อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม</b>	.....กรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กรกช นาคคนอง)
..... (รองศาสตราจารย์ ดร.จรัสศรี นวลศรี)	.....กรรมการ (รองศาสตราจารย์ ดร.จรัสศรี นวลศรี)
..... (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เสาวภา ดั่งวงปาน)	.....กรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เสาวภา ดั่งวงปาน)
	.....กรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ระวี เจียรวิภา)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้  
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

.....  
(ศาสตราจารย์ ดร.ดำรงศักดิ์ ฟาร์รุ่งสว่าง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคล  
ที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กรกช นาคคนอง)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ .....

(นางสาวชุติมา สุทธิจิตร)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน  
และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ .....

(นางสาวชุตติมา สุทจิตร)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาการแสดงออกของยีน <i>NCED</i> ที่เกี่ยวข้องกับการสะสมกรดแอบไซซิกในสภาวะขาดน้ำของต้นกล้วยพารา
ผู้เขียน	นางสาวชุตติมา สุทธิจิตร
สาขาวิชา	พืชศาสตร์
ปีการศึกษา	2562

### บทคัดย่อ

สภาวะขาดน้ำส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของพืช รวมไปถึงรูปแบบการแสดงออกของยีน พืชที่อยู่ในสภาวะขาดน้ำจะมีการปรับตัวเพื่อความอยู่รอด เช่น การปิดของปากใบเพื่อลดการคายน้ำ และรักษาสมดุลของน้ำภายในเซลล์ ซึ่งฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการนี้คือ กรดแอบไซซิก (abscisic acid; ABA) โดยยีนหลักที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ ABA คือ ยีน *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED)* งานวิจัยนี้ได้ศึกษาเกี่ยวกับปริมาณน้ำสัมพัทธ์ ปริมาณการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ ประสิทธิภาพการใช้แสง และปริมาณคลอโรฟิลล์สัมพัทธ์ของต้นกล้วยพาราพันธุ์ PB 5/51, RRIM 600, RRIM 623, RRIT 408, RRIT 251 และ BPM 24 ภายใต้สภาวะขาดน้ำในช่วงเวลาที่ต่างกันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน เมื่อต้นกล้วยพาราขาดน้ำ ปริมาณน้ำสัมพัทธ์และประสิทธิภาพการใช้แสงมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง ในขณะที่ปริมาณการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์มีค่าเพิ่มขึ้น และปริมาณคลอโรฟิลล์สัมพัทธ์ค่อนข้างคงที่ จากการตอบสนองทางสรีรวิทยาของยางพาราแต่ละพันธุ์สามารถจำแนกพันธุ์ยางพาราที่มีศักยภาพในการทนทานต่อสภาวะขาดน้ำ ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ทนทานต่อสภาวะขาดน้ำได้ดี ประกอบด้วย ยางพาราพันธุ์ RRIM 623 และ RRIT 408 กลุ่มที่ทนทานต่อสภาวะขาดน้ำได้ระดับปานกลาง ประกอบด้วย RRIT 251 และ RRIM 600 ส่วนยางพาราพันธุ์ BPM 24 และ PB 5/51 เป็นกลุ่มที่ไวต่อสภาวะขาดน้ำ จึงได้ทำการคัดเลือกต้นกล้วยพารา ซึ่งประกอบด้วย ยางพาราพันธุ์ RRIM 623, RRIT 408 และ PB 5/51 มาทำการศึกษาปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิก และการแสดงออกของยีน *NCED3* ผลการโคลนยีน *NCED3* จาก cDNA ของยางพารา พบว่า ยีน *NCED3* มีขนาด 1,785 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NCED3* ในมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) 91 เปอร์เซ็นต์ และ สับปะรด (*Jatropha curcas*) 83 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการแสดงออกของยีน *NCED3* ยางพาราพันธุ์ RRIT 408 และ RRIM 623 มีรูปแบบการแสดงออกยีน *NCED3* ที่คล้ายคลึงกัน คือ ในวันที่ 0, 1, 3 และ 5 ของการงดน้ำ การแสดงออกของยีน *NCED3* ค่อนข้างคงที่และเพิ่มขึ้นสูงสุดหลังจากทำการงดน้ำในวันที่ 7 ส่วนยางพาราพันธุ์ PB 5/51 มีการแสดงออกของยีน

NCED3 เพิ่มขึ้นหลังจากงัดน้ำตั้งแต่วันที่ 1 และเพิ่มขึ้นจนถึงจุดสูงสุดในวันที่ 5 หลังจากนั้น การแสดงออกของยีน NCED3 จะลดลงอย่างรวดเร็วโดยเฉพาะในวันที่ 9 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณ การสะสมกรดแอบไซซิก ยางพาราพันธุ์ RRIM 623 มีการสะสมกรดแอบไซซิกน้อยกว่ายางพาราพันธุ์ RRIT 408 และ PB 5/51 โดยยางพาราพันธุ์ PB 5/51 มีการสะสมกรดแอบไซซิกในช่วงแรกของการขาดน้ำ ตั้งแต่วันที่ 1 ของการงดน้ำและมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ในขณะที่ยางพาราพันธุ์ RRIT 408 และ RRIM 623 มีการสะสมกรดแอบไซซิกที่ช้ากว่า โดยมีการเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในวันที่ 7 ของ การงดน้ำ นอกจากนี้จากการตรวจสอบความไวของการปิดปากใบต่อกรดแอบไซซิก พบว่า ยางพารา พันธุ์ RRIM 623 มีความไวต่อการปิดปากใบมากกว่ายางพาราพันธุ์ RRIT 408 และ PB 5/51 ซึ่ง อาจส่งผลให้ยางพาราพันธุ์ RRIM 623 มีความสามารถในการปรับตัวได้ดีกว่า แม้ว่าจะมีปริมาณ การสะสมกรดแอบไซซิกในปริมาณที่น้อยกว่ายางพาราพันธุ์ RRIT 408 และ PB 5/51 ภายใต้สภาวะแล้ง

Thesis Title	Study of <i>9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED)</i> Gene Expression Involved in ABA Accumulation during Water Deficit Condition in Rubber Tree Seedlings
Author	Miss Chutima Sutjit
Major Program	Plant Science
Academic Year	2019

### ABSTRACT

Drought condition affects the physiological changes of plant and gene expression patterns. Under drought condition, plants have to adapt for survival such as stomatal closure to reduce dehydration and to maintain water balance in the cell. The hormone that associated with this process is ABA (abscisic acid) which synthesized by *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED)* gene. This research was studied on morphology relative water content, maximum quantum efficiency of photosystem II ( $F_v/F_m$ ), electrolyte leakage and relative chlorophyll content of PB 5/51, RRIM 600, RRIM 623, RRIT 408, RRIT 251 and BPM 24 rubber clones under water deficit condition at 0, 1, 3, 5, 7, 9 and 11 days. Under drought condition dehydrated, relative water content and maximum quantum efficiency of photosystem II ( $F_v/F_m$ ) were continuously decreased while the electrolyte leakage increased and relative chlorophyll content was stable. Based on the physiological responses of rubber clones, they were divided into three groups: drought tolerance group includes RRIM 623 and RRIT 408. The moderate tolerance group includes RRIT 251 and RRIM 600. The susceptible group includes BPM 24 and PB 5/51. Subsequently, RRIM 623, RRIT 408 and PB 5/51 were chosen for investigation of abscisic acid accumulation and gene expression of *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED)* under drought condition. Therefore, *NCED3* gene from rubber tree was cloned and analyzed. The cDNA of *NCED3* gene contains a complete open reading frame (ORF) of 1,785 bps. The nucleotide sequence showed similarity to the *NCED3* gene from *Manihot esculenta* 91% and *Jatropha curcas* 83%. For gene expression analysis. RRIT 408 and RRIM 623 exhibited similar expression pattern with stable expression at 0, 1, 3 and 5 days



after water withholding and increased to the highest level at 7 days after water withholding. PB 5/51 showed the increased expression of *NCED3* gene after 1 day of water withholding and reached maximum level at 5 days after water withholding then decreased especially on 9 days after water withholding. However, *NCED3* transcription level of RRIT 408 and PB 5/51 showed higher expression compare to RRIM 623 which is drought tolerant clone and corresponded to the accumulation of abscisic acid. RRIM 623 accumulated abscisic acid less than RRIT 408 and PB 5/51. PB 5/51 rapidly increased in abscisic acid at the early stage of drought condition while RRIT 408 and RRIM 623 gradually increased especially at 7 days after water withholding. In addition, sensitivity of stomata response to abscisic acid showed that RRIM 623 have higher sensitivity than RRIT 408 and PB 5/51. This may result in better drought adaptation of RRIM 623 even though the amount of abscisic acid accumulation was less than that of RRIT 408 and PB 5/51 during drought conditions.

## กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กรกช นาคคนอง อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นอย่างสูงที่กรุณาให้คำแนะนำในการค้นคว้าวิจัย และแก้ไขปัญหาต่างๆ รวมทั้งอบรมสั่งสอนแนะแนวทางสำหรับกรวิจัย การตรวจทานแก้ไข และการเขียนวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.จรัสศรี นวลศรี ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เสาวภา ดั่งปาน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำในงานวิจัยและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ระวี เจียรวิภา กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำในการค้นคว้าวิจัย ตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. สายัณห์ สดุดี กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้เกียรติมาเป็นประธานกรรมการสอบ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ซึ่งวิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

ขอขอบพระคุณสถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร และทรัพยากรธรรมชาติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ และภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ สนับสนุนเงินทุนในการทำวิทยานิพนธ์ และให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ ตลอดจนวัสดุอุปกรณ์ต่างๆ

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ประจำศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กิจการ สุขุมมาตย์ ภาควิชาวาริชศาสตร์ และภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ ตลอดจนวัสดุอุปกรณ์ต่างๆ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ น้องชาย และครอบครัว ตลอดจนผู้ที่มีพระคุณทุกท่าน ที่ให้การสนับสนุนช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน ทั้งคอยให้กำลังใจ ผลักดัน และคอยเป็นที่ปรึกษามาโดยตลอดจนสำเร็จการศึกษา

ชุตินา สุทธิจิตร

## สารบัญ

สารบัญ	หน้า
รายการตาราง	(11)
รายการภาพประกอบ	(12)
รายการภาพภาคผนวก	(15)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	16
2. วิธีการวิจัย	17
วัสดุและอุปกรณ์	17
วิธีดำเนินการ	24
3. ผล	39
4. บทวิจารณ์	56
5. บทสรุปและข้อเสนอแนะ	62
เอกสารอ้างอิง	64
ภาคผนวก	72
ประวัติผู้เขียน	80

## รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชื่อพันธุ์ของต้นกล้ายางพารา และสถานที่เก็บเมล็ดพันธุ์ยางพาราที่ใช้ในการทดลอง	17
2	ชนิดของไพรมอร์สำหรับการโคลนยีน <i>NCED3</i>	28
3	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>NCED3</i> ของยางพารากับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม nucleotide blast	49
4	ความกว้างของปากใบ (stomatal aperture) ในต้นกล้ายางพารา 3 พันธุ์ ต่อกรดแอบไซซิกที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 20, 50 และ 100 $\mu$ M	54

## รายการภาพประกอบ

ภาพที่	หน้า
1 การตอบสนองของพืชต่อสภาวะขาดน้ำ	6
2 กระบวนการสังเคราะห์กรดแอบไซซิก	15
3 ระดับการประเมินลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นกล้ายางพารา	25
4 การศึกษาปริมาณความชื้นดินภายในภาชนะปลูกของต้นกล้ายางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้อุณหภูมิ 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตามลำดับ	40
5 ระดับการประเมินลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นกล้ายางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้อุณหภูมิ 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตามลำดับ	40
6 ลักษณะสัณฐานวิทยา ของต้นกล้ายางพาราพันธุ์ PB 5/51, RRIM 600, RRIM 623, RRIT 408, RRIT 251 และ BPM 24 ภายใต้อุณหภูมิ 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตามลำดับ	41
7 ลักษณะสัณฐานวิทยา ของต้นกล้ายางพาราพันธุ์ PB 5/51, RRIM 600, RRIM 623, RRIT 408, RRIT 251 และ BPM 24 หลังจากรดน้ำเป็นเวลา 11 วัน และทำการให้น้ำ (re-watering) เป็นเวลา 2 สัปดาห์	42
8 ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ของต้นกล้ายางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้อุณหภูมิ 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตามลำดับ	43
9 ปริมาณการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ในใบ ของต้นกล้ายางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้อุณหภูมิ 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตามลำดับ	44
10 ค่าประสิทธิภาพการใช้แสงของต้นกล้ายางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้อุณหภูมิ 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตามลำดับ	45
11 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>NCED3</i> บริเวณส่วนกลางยีน ขนาด 461 นิวคลีโอไทด์	45
12 ผลการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จาก cDNA ส่วนใบของยางพารา อุณหภูมิที่เหมาะสมของไพรเมอร์ AF2 (forward primer) และ AR1 (reverse primer) คือ 56.2 องศาเซลเซียส และได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 461 นิวคลีโอไทด์ เมื่อเปรียบเทียบกับ GeneRuler 100 bp DNA Ladder (M)	46
13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>NCED3</i> บริเวณส่วนกลางยีน ขนาด 461 นิวคลีโอไทด์	47

### รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	ผลการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จาก cDNA ส่วนใบของยางพารา คุณหมุมิที่เหมาะสมของ ไพรเมอร์ FNCE3 (forward primer) และ RNCE3 (reverse primer) คือ 58 องศาเซลเซียส และได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,785 นิวคลีโอไทด์ เมื่อเปรียบเทียบกับ GeneRuler 100 bp DNA Ladder (M)	48
15	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนโปรตีน <i>NCED3</i> ของยางพารากับ <i>Manihot esculenta</i> ( <i>MeNCED3</i> , XM021737795.1), <i>Jatropha curcas</i> ( <i>JcNCED3</i> , XM01228949.2), <i>Durio zibethinus</i> ( <i>DzNCED3</i> , XM022861706.1) และ <i>Theobroma cacao</i> ( <i>TcNCED3</i> , XM007022118.2) จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม GeneDoc	50
16	แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของโปรตีน <i>NCED3</i> จากยางพารา กับ โปรตีน <i>NCED3</i> ในพืชอื่นๆ 17 ชนิด จาก GenBank ด้วยโปรแกรม MEGA 6 ตัวเลขบนแขนง (node) แสดงเปอร์เซ็นต์ความน่าเชื่อถือจากการคำนวณด้วย bootstrap root test จำนวน 1,000 รอบ โดยมีเลข accession number ดังนี้ <i>Herrania umbratica</i> ( <i>HuNCED3</i> , XM021432968.1), <i>Theobroma cacao</i> ( <i>TcNCED3</i> , XM007022118.2), <i>Durio zibethinus</i> ( <i>DzNCED3</i> , XM022861706.1), <i>Gossypium raimondii</i> ( <i>GrNCED3</i> , XM012609894.1), <i>Gossypium arboreum</i> ( <i>GaNCED3</i> , XM017784246.1), <i>Populus trichocarpa</i> ( <i>PtNCED3</i> , XM006370119.1), <i>Manihot esculenta</i> ( <i>MeNCED3</i> , XM021737795.1), <i>Solanum pennellii</i> ( <i>SpNCED3</i> , XM015224874.1), <i>Nicotiana tabacum</i> ( <i>NtNCED3</i> , KM605434.1), <i>Lycium barbarum</i> ( <i>LbNCED3</i> , JQ319069.1), <i>Lycium chlnense</i> ( <i>LcNCED3</i> , KJ123695.1), <i>Carica papaya</i> ( <i>CpNCED3</i> , XM022039358.1), <i>Malus x domestica</i> ( <i>MdNCED3</i> , XM008384748.2), <i>Brassica napus</i> ( <i>BnNCED3</i> , NM001315973.1), <i>Arabidopsis thaliana</i> ( <i>AtNCED3</i> , NM112304.3), <i>Camellina sativa</i> ( <i>CsNCED3</i> , XM010488950.2)	51

## รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
17	ระดับการแสดงออกของยีน <i>NCED3</i> จากชิ้นส่วนใบ ของต้นกล้ายางพาราพันธุ์ PB 5/51, RRIT 408 และ RRIM 623 ภายใต้สภาวะขาดน้ำ เป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตามลำดับ	52
18	ปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกของต้นกล้ายางพาราพันธุ์ PB 5/51, RRIT 408 และ RRIM 623 ภายใต้สภาวะขาดน้ำ เป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตามลำดับ	53
19	การตอบสนองของปากใบในยางพาราพันธุ์ RRIM 623, RRIT 408 และ PB 5/51 ต่อปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกที่ความเข้มข้นในระดับต่างๆ ได้แก่ 0, 10, 20, 50 และ 100 $\mu\text{M}$	55

**รายการภาพภาคผนวก**

<b>ภาพภาคผนวกที่</b>		<b>หน้า</b>
1	ระบบรากแบบหยั่งลึกของยางพารา 3 พันธุ์ ได้แก่ PB 5/51 , RRIM 623 และ RRIT 408 ภายใต้การให้น้ำปกติและภายใต้สภาวะขาดน้ำ	78
2	การศึกษาอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ภายใต้สภาวะโรงเรือน ตลอดจนการทดลองตั้งแต่วันที่ที่น้ำ 0 -11 วัน ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ ปี พ.ศ.2561	79



## บทที่ 1

### บทนำ

#### บทนำต้นเรื่อง

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) เป็นพืชที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของภาคใต้และประเทศไทย ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกยางพารามากเป็นอันดับสองของโลกรองจากประเทศอินโดนีเซีย มีเกษตรกรที่ปลูกยางพารารวมทั้งประเทศประมาณ 6 ล้านคน หรือประมาณร้อยละ 10 ของประชากรทั้งประเทศ (สถาบันวิจัยยาง, 2560)

ปัจจุบันการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศโลก และสภาวะโลกร้อนโดยเฉพาะอุณหภูมิที่สูงขึ้นส่งผลให้เกิดปัญหาความแห้งแล้งที่มีความรุนแรงมากขึ้น ปัญหาดังกล่าวส่งผลกระทบต่อภาคเกษตรกรรม เมื่อพืชตกอยู่ในสภาวะแล้ง พืชเกิดการตอบสนองต่อความเครียด โดยในสภาวะขาดน้ำจะทำให้ น้ำในดินลดลง จนถึงสภาวะที่พืชมีอัตราการคายน้ำมากกว่าอัตราการดูดน้ำ พืชไม่สามารถดูดน้ำที่อยู่ภายนอกเข้าสู่เซลล์ได้ สภาพอากาศที่แห้งแล้งทำให้พืชสูญเสียน้ำจากการคายน้ำ ส่งผลกระทบต่อทั้งในระดับเซลล์ และกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ เช่น ทำให้อัตราการสังเคราะห์แสงลดลง เนื่องจากพื้นที่ใบลดลง ใบพืชมีการเหี่ยว ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$ ) ที่เข้าสู่ใบลดลง การสังเคราะห์โปรตีน และโพลีไรโบโซม (polyribosome) ของพืชลดลง ปริมาณอาร์เอ็นเอส (RNase) และไรโบโซม (ribosome) เพิ่มขึ้น การเกิดสารอนุมูลอิสระหรือสารประกอบออกซิเจนที่ไวต่อปฏิกิริยา (reactive oxygen species; ROS) ซึ่งสารดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็นตัวออกซิแดนท์อย่างรุนแรงที่สามารถทำลายโมเลกุลของสารต่างๆ เช่น ดีเอ็นเอ โปรตีน เยื่อหุ้มเซลล์ รวมทั้งโครงสร้างของเซลล์พืช ทำให้เซลล์ตาย ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้อัตราการเจริญเติบโต และผลผลิตลดลง (Osakabe *et al.*, 2014)

สภาวะขาดน้ำส่งผลกระทบต่อการปลูกสร้างสวนยางพารา โดยในระยะต้นกล้าหากมีปริมาณน้ำที่ไม่เพียงพอจะทำให้ต้นกล้าได้รับความเสียหาย และตายเป็นจำนวนมาก ส่วนในระยะที่ให้ผลผลิต หากมีปริมาณน้ำที่ไม่เพียงพอจะทำให้ผลผลิตน้ำยางลดลงได้ ซึ่งวิธีการแก้ปัญหาเบื้องต้น สำหรับปัญหาสภาวะโลกร้อนและสภาวะขาดน้ำในยางพาราที่ดีที่สุด คือการคัดเลือกต้นกล้ายางพาราที่สามารถทนต่อสภาวะแล้งได้ ดังนั้น การปรับปรุงพันธุ์ยางพาราที่ทนต่อสภาวะแล้งจึงมีความจำเป็นอย่างมาก ในปัจจุบันมีการคิดค้นวิธีการต่างๆ ที่สามารถใช้ใน

การตรวจสอบการตอบสนองทางสรีรวิทยาของพืชได้ โดยสามารถนำข้อมูลดังกล่าวมาใช้ในการคัดเลือก และปรับปรุงพันธุ์ที่ต้องการได้ อีกทั้งยังมีการนำเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลมาใช้เพื่อลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ในไม้ยืนต้นอย่างยาวพาราอีกด้วย นอกจากนี้สภาวะขาดน้ำส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยา กระบวนการทางชีวเคมีรวมถึงรูปแบบการแสดงออกของยีนหลายประการ พืชที่อยู่ในสภาวะขาดน้ำจะมีการตอบสนองเพื่อความอยู่รอด เช่น การปิดของปากใบเพื่อลดการคายน้ำ การสังเคราะห์แสงจะลดลง ซึ่งฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการนี้คือกรดแอบไซซิก โดยยีนที่สำคัญคือ *NCED3* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดแอบไซซิก พืชที่มีแนวโน้มทนต่อสภาวะขาดน้ำจะมีความสามารถในการสะสมกรดแอบไซซิกเพื่อลดความเสียหายของเซลล์ที่เกิดจากสภาวะขาดน้ำ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา การตอบสนองทางสรีรวิทยา และการศึกษาการแสดงออกของยีน *NCED3* ที่เกี่ยวข้องกับการสะสมปริมาณกรดแอบไซซิกในยางพาราภายใต้สภาวะขาดน้ำ หากการแสดงออกของยีน *NCED3* สอดคล้องกับการสะสมปริมาณกรดแอบไซซิก การตอบสนองทางสรีรวิทยาและทางสรีรวิทยา ก็สามารถนำข้อมูลดังกล่าว เพื่อการคัดเลือกต้นกล้ายางพาราที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำได้

## การตรวจเอกสาร

### 1. ความสำคัญของน้ำต่อพืช และสภาวะขาดน้ำ

น้ำเป็นองค์ประกอบสำคัญของพืช มีอยู่ในเซลล์พืชประมาณ 85 - 90% ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืชทั้งกระบวนการทางฟิสิกส์และเคมี เช่น เป็นตัวทำละลายที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยาเคมีในกระบวนการสังเคราะห์แสง ช่วยในการลำเลียงธาตุอาหารไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ของพืช น้ำเป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์พืช ซึ่งน้ำเป็นตัวช่วยรักษาความเต่งของเซลล์ (cell turgidity) ซึ่งมีผลต่อการเปิดปิดปากใบ ช่วยรักษาสภาพโครงสร้างของโพรโทพลาสซึม การพัฒนาและการขยายขนาดของเซลล์พืช น้ำยังเป็นองค์ประกอบของสารอินทรีย์ภายในเซลล์ หากในเซลล์มีปริมาณน้ำที่ไม่เพียงพอทำให้เกิดความผิดปกติของเซลล์ได้ อีกทั้งมีส่วนช่วยรักษาระดับอุณหภูมิภายในเซลล์พืชให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม (สายัณห์, 2534) นอกจากนี้ น้ำถือเป็นปัจจัยสำคัญมากที่สุดในการจำกัดผลผลิตทางการเกษตร เพราะฉะนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ควรศึกษาการตอบสนองของพืชเศรษฐกิจต่อสภาวะขาดน้ำ

สภาวะขาดน้ำ คือ สภาวะที่เกิดขึ้นเนื่องจากอัตราการคายน้ำของพืชมากกว่าอัตราการดูดน้ำของพืช ส่งผลให้ปริมาณน้ำในพืชลดลงจนมีผลต่อสรีรวิทยาของพืช ซึ่งมีการตอบสนองที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับระดับความรุนแรงของการขาดน้ำ และช่วงเวลาของการขาดน้ำของพืช (สายัณห์, 2534) น้ำเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อกระบวนการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืช สภาวะขาดน้ำเกิดขึ้นได้หลายสาเหตุ เช่น ความแล้ง สภาพดินเค็ม หรือแม้แต่สภาพอุณหภูมิต่ำ สภาพเหล่านี้ทำให้พืชไม่สามารถดูดน้ำที่อยู่ภายนอกเข้าสู่เซลล์ได้ สภาวะขาดน้ำทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยา กระบวนการทางชีวเคมี รวมถึงการแสดงออกของยีน (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1997) การเปลี่ยนแปลงบางอย่างเป็นผลกระทบบที่เกิดขึ้นจากสภาวะขาดน้ำ เช่น อัตราการการเจริญเติบโต อัตราการสังเคราะห์แสง การดูดซึมธาตุอาหารในเนื้อเยื่อพืช การสังเคราะห์น้ำตาล แป้ง และโปรตีนลดต่ำลง การเกิดสารประกอบออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยา (reactive oxygen species) เป็นต้น แต่ในขณะเดียวกันการเปลี่ยนแปลงบางอย่างเกิดขึ้นเนื่องจากการปรับตัวของพืช เช่น การสังเคราะห์ฮอร์โมน อย่างกรดแอบไซซิกเพิ่มมากขึ้น เพื่อควบคุมการปิดปากใบ ช่วยให้พืชลดการคายน้ำ หรือแม้แต่การสะสมตัวถูกละลายบางชนิด เช่น โพรลีน น้ำตาลแอลกอฮอล์ หรือน้ำตาลในปริมาณที่สูงขึ้น เพื่อรักษาสมดุลของน้ำในเซลล์

## 2. กลไกการปรับตัวต่อสภาวะขาดน้ำในพืช

สภาวะขาดน้ำในพืชจะส่งผลต่อสรีรวิทยาของพืช โดยเมื่อพืชมีการขาดน้ำ จะมีการตอบสนองทางสรีรวิทยาเพื่อปรับตัวในการอยู่รอด ได้แก่ การปิดเปิดของปากใบและการสังเคราะห์ด้วยแสง สภาวะขาดน้ำมีผลต่อการสังเคราะห์แสงของพืช และยังส่งผลให้มีการปิดของปากใบ ทำให้การใช้  $\text{CO}_2$  ลดลง เพราะ  $\text{CO}_2$  จะผ่านเข้าออกทางปากใบ จัดว่าเป็นกระบวนการตอบสนองที่เร็วที่สุด (สಾಯน์, 2534) ซึ่งการตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำดังกล่าวจะส่งผลต่อการปรับตัวของพืช โดยพืชมีกลไกการปรับตัวต่อสภาวะขาดน้ำ ซึ่งจำแนกได้ 3 ประเภท ดังนี้

2.1 การหนีแล้ง (drought escape) หมายถึง พืชที่สามารถจบวงจรชีวิตก่อนที่จะเกิดสภาวะขาดน้ำได้ เช่น การพัฒนาอย่างรวดเร็วเป็นความสามารถของพืชที่ทำให้พืชเจริญครบวงจรได้รวดเร็วขึ้น เมื่อพืชได้รับผลกระทบจากสภาวะขาดน้ำ นอกจากนี้การขยายเวลาช่วงออกดอกติดผล เป็นความสามารถของพืชในการขยายระยะเวลาของการออกดอกออกไปได้ เมื่อพืชได้รับน้ำหรือมีฝนตกภายหลังจากผ่านช่วงแล้ง ทำให้พืชฟื้นตัวและออกดอกให้ผลผลิตได้ เช่น พืชตระกูลถั่ว

2.2 การทนแล้ง (drought tolerance) หมายถึง พืชที่ทนทานต่อสภาวะขาดน้ำได้โดยการลดศักยภาพของน้ำ รักษาความเต่งของเซลล์ด้วยการสะสมของสารละลายภายในเซลล์ในสภาวะขาดน้ำ ดังนั้นจึงทำให้ค่า osmotic potential สูงขึ้น ทำให้ค่า turgor pressure เพิ่มขึ้นด้วย

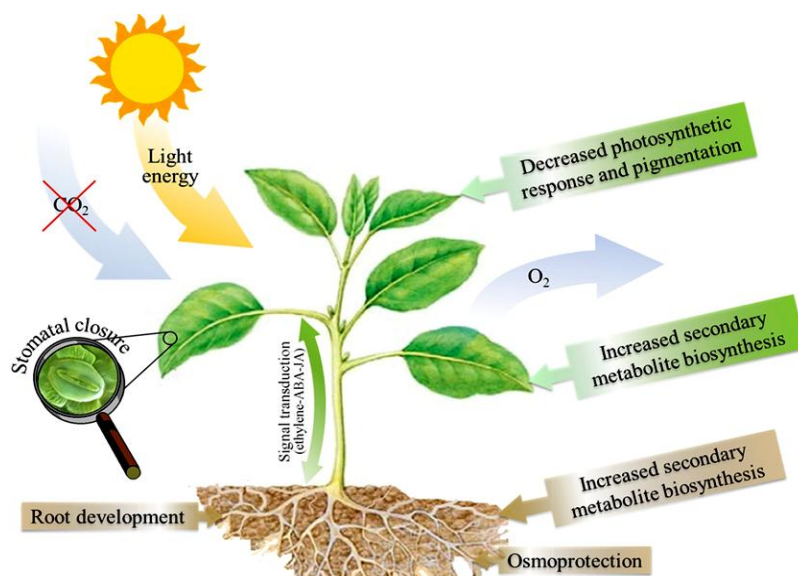
2.3 การทนแล้งโดยรักษาศักยภาพของน้ำ (drought avoidance) หมายถึง ความสามารถของการทนแล้งที่เกี่ยวข้องกับกลไกการลดการสูญเสียน้ำของพืช (Taiz and Zeiger, 1991) และรักษาระดับในการดูดน้ำของพืช เช่น ลดการสูญเสียน้ำโดยการปิดปากใบ การม้วนใบ การสะท้อนของใบ และการลดพื้นที่ใบ เพื่อรักษาระดับการดูดน้ำของพืชที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของรากที่เพิ่มขึ้น และเมื่อการเจริญทางยอดลดลง รากพืชจะสามารถหยั่งลึกและแพร่กระจายได้ดีขึ้น ส่งผลให้พืชสามารถดูดน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (สಾಯน์, 2534)

### 3. การตอบสนองของพืชต่อสภาวะขาดน้ำ

พืชมีกลไกในการปรับตัว โดยพืชมีการรับสภาพความเครียดแล้วเกิดการรับรู้ และการจดจำ (recognition) การเกิดลักษณะความเครียดนั้น เมื่อเกิดความเครียดอีกพืชจะมีการแปลงและส่งสัญญาณ (signal transduction) ให้มีการเกิดการเปลี่ยนแปลงระดับยีนเพื่อเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน (gene expression) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลหรือเมแทบอลิซึมระดับเซลล์ ส่งผลต่อกระบวนการทางสรีรวิทยา (physiology) ทางด้านการเจริญเติบโต (development) (เอ็จ, 2554)

#### 3.1 การตอบสนองทางสรีรวิทยาต่อสภาวะขาดน้ำในพืช

สภาวะขาดน้ำเกิดขึ้นเนื่องจากพืชมีอัตราการคายน้ำมากกว่าการดูดซับน้ำไปใช้ สภาวะขาดน้ำเกี่ยวเนื่องอย่างมากกับความชื้นในดิน โดยคุณสมบัติการเก็บน้ำในดิน (soil water retention) ขึ้นอยู่กับลักษณะของเนื้อดิน ความชื้นในดินที่พืชสามารถนำไปใช้ได้คิดจากผลต่างระหว่างค่าความชื้นชลประทาน (field capacity) กับค่าความชื้นที่จุดเหี่ยวเฉา (permanent wilting point) โดยค่าความชื้นชลประทาน คือ น้ำที่ดินสามารถดูดซับไว้ได้หลังจากที่น้ำอิสระ (free water) ถูกระบายออกหมด ในระยะนี้ความชื้นในดินจะมีการเปลี่ยนแปลงน้อย เหลืออยู่เฉพาะปริมาณน้ำที่ดินสามารถดูดซับไว้ได้เต็มที่ (capillary water) ส่วนความชื้นที่จุดเหี่ยวเฉาถาวร คือ ความชื้นในดินที่ต้นพืชไม่สามารถดูดซับมาใช้ได้ และหลังจากนั้นพืชจะเริ่มมีการเหี่ยวเฉาอย่างถาวร (สายัณห์, 2534) สภาวะขาดน้ำส่งผลต่อการผลิตอาหารของพืช โดยการเปิดปิดปากใบลดลงทำให้ช่องทางที่พืชรับคาร์บอนไดออกไซด์มาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงลดลง ส่งผลต่อการดูดซึมน้ำและธาตุอาหารอีกด้วย (สายัณห์, 2537) เมื่ออัตราการหายใจของพืช การลำเลียงอาหาร และการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ลดลงเกือบเป็น 0 ส่งผลให้ค่าศักย์ของน้ำ (water potential) มีค่าเท่ากับ -10 ถึง -20 bars ในขณะที่กิจกรรมของ hydrolytic enzymes เพิ่มขึ้น (นวรรตน์ และคณะ, 2542) นอกจากนี้ภายใต้สภาวะขาดน้ำหากมีการให้น้ำแก่พืชอีกครั้ง พืชจะสามารถฟื้นตัวได้อีก ถึงแม้ว่าการเจริญเติบโตและอัตราการสังเคราะห์แสงของใบอ่อนจะมีประสิทธิภาพลดลง ส่วนการเจริญเติบโตของรากในสภาวะที่พืชได้รับน้ำสม่ำเสมอ ระบบรากส่วนใหญ่จะอยู่ที่ผิวดินชั้นบน แต่เมื่อความชื้นที่ผิวดินลดลงเนื่องจากสภาวะขาดน้ำ ส่งผลให้การเจริญเติบโตของรากที่ผิวดินชั้นบนลดลง รากพืชจะมีการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดโดยการขนานโซ่ไปในดินชั้นล่างเพื่อรักษาความสมดุลของน้ำในต้นพืช (สายัณห์, 2534) ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 การตอบสนองของพืชต่อสภาวะขาดน้ำ

ที่มา: Zingaretti และคณะ (2013)

เมื่อพืชอยู่ในสภาวะขาดน้ำ มีกระบวนการตอบสนองทางสรีรวิทยาเกิดขึ้นอย่างมาก โดยปริมาณน้ำในใบ (relative water content) เป็นตัวบ่งชี้ที่สามารถตรวจสอบได้อย่างชัดเจนเมื่อพืชขาดน้ำ เป็นการเปรียบเทียบปริมาณน้ำในช่วงเวลาหนึ่งกับใบที่อิ่มตัวด้วยน้ำ และใบที่ถูกดึงน้ำออก ซึ่งสอดคล้องและสัมพันธ์กับการวัดศักยภาพของน้ำในใบพืช (เฉลิมพล, 2535) การเกิดสภาวะขาดน้ำอย่างรุนแรง ทำให้พืชมีการปรับแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ซึ่งเป็นกลไกที่พืชพยายามควบคุมศักยภาพของน้ำ ในส่วนต่างๆ ของลำต้นให้อยู่ในสมดุล จะทำให้อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงและการหายใจของพืชลดลง อาการเหี่ยวและร่วงของใบเป็นการปรับตัวเพื่อการอยู่รอดของต้นพืช ซึ่งถือว่าเป็นกระบวนการตอบสนองที่ไวที่สุด

การสังเคราะห์แสงของพืช เป็นกระบวนการทางสรีรวิทยาที่พืชดูดซับพลังงานแสงแล้วเปลี่ยนเป็นพลังงานเคมีสะสมไว้ในรูปสารประกอบคาร์โบไฮเดรต ซึ่งเป็นสารประกอบคาร์บอนที่มีพลังงานสูง เช่น น้ำตาล และแป้ง แล้วนำไปใช้ในกระบวนการต่างๆ ของพืช โดยผ่านกระบวนการหายใจ (นิวัติ, 2535) การสังเคราะห์แสงได้รับอิทธิพลจากปัจจัยหลายประการ ทั้งปัจจัยสิ่งแวดล้อมภายนอก ได้แก่ ความเข้มแสง อุณหภูมิ และความชื้นในอากาศ เป็นต้น และปัจจัยภายในพืชที่สำคัญ ได้แก่ อายุใบ และปริมาณคลอโรฟิลล์ภายในใบ เป็นต้น (พูนพิภพ, 2549) เมื่อพืชตกอยู่ในสภาวะขาดน้ำ ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบพืชจะลดลง อาจสร้างความเสียหายในระดับเซลล์พืช ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์

ถูกทำลายสารอิเล็กทรอนิกส์ต่างๆ ภายในเซลล์เกิดการรั่วไหลออกมาภายนอกเซลล์ ซึ่งสามารถวัดค่าการนำไฟฟ้าในสารละลายที่มีชิ้นส่วนพืชได้ โดยค่าการนำไฟฟ้าในสารละลายของพืชที่ได้รับสภาวะเครียดจะสูงกว่าพืชที่อยู่ในสภาวะปกติ กล่าวคือ ความรุนแรงของสภาวะขาดน้ำที่พืชได้รับส่งผลให้การรั่วไหลของสารอิเล็กทรอนิกส์ของชิ้นส่วนใบพืชเพิ่มสูงขึ้น (คงเอก, 2558) ความเสียหายในระดับเซลล์ที่เกิดขึ้นส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชด้วย โดยทั่วไปพืชที่สามารถสังเคราะห์แสงได้จะประกอบด้วยรงควัตถุ ซึ่งสามารถแบ่งได้หลายชนิด แต่ละชนิดมีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกัน รงควัตถุจำพวกคลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุสีเขียวที่พบมากในพืชทำหน้าที่สำคัญในการดูดซับพลังงานจากแสงอาทิตย์และกระตุ้นปฏิกิริยาแสงในกระบวนการสังเคราะห์แสง คลอโรฟิลล์มีหลายชนิด ได้แก่ คลอโรฟิลล์เอ บี ซี และดี เป็นต้น โดยแต่ละชนิดมีโครงสร้างและคุณสมบัติต่างกันไป เช่น คลอโรฟิลล์เอดูดแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวช่วงคลื่นซึ่งมีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่ 680 และ 700 นาโนเมตร สำหรับคลอโรฟิลล์บีสามารถดูดแสงได้ดีในหลายความยาวคลื่น ได้แก่ 480, 640 และ 650 นาโนเมตร (สมบุญ, 2537) สุนทรและธาดา (2543) อธิบายว่าเมื่อพลังงานแสงส่องกระทบใบพืช ใบจะมีการถ่ายเทพลังงานได้หลายวิธี วิธีหลัก คือ การใช้พลังงานแสงในกระบวนการสังเคราะห์แสง พลังงานส่วนเกินจะระบายโดยเป็นคลื่นความร้อน และแผ่รังสีฟลูออเรสเซนซ์ การวัดรังสีฟลูออเรสเซนซ์จึงเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ประเมินประสิทธิภาพของกระบวนการสังเคราะห์แสงได้ โดยพลังงานที่ได้รับมีการส่งผ่านอิเล็กตรอน ไปยังศูนย์กลางของปฏิกิริยาการสังเคราะห์แสง จาก photosystem II ไปยัง photosystem I การวัดรังสีฟลูออเรสเซนซ์จึงเป็นวิธีหนึ่งที่ยิมนำมาใช้ประเมินประสิทธิภาพของการสังเคราะห์แสง ซึ่งเป็นการให้แสงอย่างเต็มที่แก่ส่วนของใบที่วัด แล้วตรวจอ่านระดับฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้ โดยเครื่องวัดจะให้แสงความเข้มต่ำก่อน ซึ่งเครื่องจะอ่านค่า  $F_0$  (minimum fluorescence) หลังจากนั้นเครื่องจะส่องแสงความเข้มสูงมากเพื่อให้เกิดการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนเต็มกำลังรับของระบบ photosystem II คือให้ reaction centers อยู่ในสภาพปิดหมด เพื่อให้เกิดรังสีฟลูออเรสเซนซ์เต็มที่ ค่าที่เครื่องอ่านในช่วงนี้คือ  $F_m$  (maximum fluorescence) เมื่อพลังงานถูกส่งต่อไปยัง photosystem I การเปล่งฟลูออเรสเซนซ์ของคลอโรฟิลล์ก็จะลดลงสู่ระดับต่ำสุดอีกครั้ง ตัวรับอิเล็กตรอนก็จะสามารถรับพลังงานแสงได้อีกครั้ง ความต่างระหว่างค่า  $F_m$  และ  $F_0$  เรียกว่า variable fluorescence ( $F_v$ ) คือความสามารถของ photosystem II ในการรับพลังงานแสงแล้วถ่ายทอดไปสู่ photosystem I มีสูตรดังนี้  $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$  (นวลมณี, 2553) การศึกษาคลอโรฟิลล์ฟลูออเรสเซนซ์ เป็นการวัดอัตราส่วนของ  $F_v/F_m$  ซึ่งแสดงถึงความสามารถของ photosystem II (PSII) ในการรับพลังงานจากรังสีดวงอาทิตย์และถ่ายทอดพลังงานไปสู่ photosystem I (PSI) ซึ่งอิทธิพลของสภาพแวดล้อม

มีผลต่อค่า  $F_v$  และ  $F_m$  ในพืช โดยค่า  $F_v$  มีค่าต่ำเมื่ออยู่ในสภาวะเครียด เช่น ความร้อน ส่วนค่า  $F_m$  ลดลงเมื่อความเข้มแสงสูง แต่ไม่เปลี่ยนแปลงโดยอุณหภูมิ ซึ่งอัตราส่วนระหว่าง  $F_v/F_m$  มีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการใช้แสง (Krause and Weis, 1991)

สภาวะขาดน้ำจะมีผลต่อการเปิดปิดปากใบ และกิจกรรมของการสังเคราะห์แสงในใบ การปิดปากใบระหว่างการขาดน้ำในช่วงแรกๆ ประสิทธิภาพการใช้น้ำอาจเพิ่มขึ้น แต่เมื่อสภาวะขาดน้ำเริ่มรุนแรงขึ้น ประสิทธิภาพในการใช้น้ำก็เริ่มลดลงเช่นกัน (Sung and Krieg, 1979) Sangsing และ Rattanawong (2012) ได้ทำการเปรียบเทียบความสามารถในการทนแล้งของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 พบว่า ยางพาราพันธุ์ RRIM 600 จะปิดปากใบเร็วกว่า RRIT 251 เมื่ออยู่ในสภาวะขาดน้ำส่งผลให้ RRIM 600 มีความทนทานต่อสภาวะขาดน้ำดีกว่าพันธุ์ RRIT 251 เล็กน้อย เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sittichai และ Sdoodee (2013) ที่ทำการศึกษารอบสองทางสรีรวิทยาต่อสภาวะแล้ง พบว่ายางพาราพันธุ์ RRIM 600 มีแนวโน้มที่สามารถทนต่อสภาวะแล้งได้ดีกว่า RRIT 251 เพียงเล็กน้อยจากการศึกษาค่าชักนำการเปิดปิดปากใบ พบว่า ยางพาราพันธุ์ RRIM 600 มีค่าลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากงดน้ำเป็นเวลา 8 วัน ในขณะที่ยางพาราพันธุ์ RRIT 251 จะค่อยๆ ลดลงในวันที่ 10 ของการงดน้ำแต่ค่าศักยภาพของน้ำในใบยางพาราพันธุ์ RRIT 251 ลดลงอย่างรวดเร็ว การสังเคราะห์แสงและการคายน้ำของยางพาราทั้ง 2 พันธุ์ มีค่าลดลงในสภาวะขาดน้ำ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

### 3.2 การตอบสนองทางชีวโมเลกุลต่อสภาวะขาดน้ำในพืช

ในสภาวะขาดน้ำ เซลล์พืชเกิดการตอบสนองอย่างรวดเร็ว เพราะน้ำเป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำค่า matric potential ของดินจะเป็นลบมากขึ้น พืชจะดูดน้ำต่อไปได้โดยค่าศักย์ของน้ำภายในพืชมีค่าต่ำกว่าศักย์ของน้ำในดิน การปรับค่าออสโมติก (osmotic adjustment) หรือการสะสมสารบางชนิดโดยเซลล์ซึ่งทำให้ค่า osmotic potential เป็นลบมากขึ้น เป็นกระบวนการที่ทำให้ค่าศักย์ของน้ำลดลงได้ โดยที่ค่าแรงเต่งไม่ลด การเปลี่ยนแปลงค่าศักย์ของน้ำในเนื้อเยื่อเกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงของ osmotic pressure ซึ่งเป็น osmotic component ของค่าศักย์ของน้ำการเกิดการปรับค่าออสโมติกแตกต่างจากการที่มีความเข้มข้นของสารละลายเพิ่มขึ้นในเซลล์ที่สูญเสียน้ำหรือกำลังหดตัว แต่การปรับค่าออสโมติกเป็นการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารทั้งหมดต่อเซลล์โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาตรเซลล์ เนื่องจากการขาดน้ำ การเพิ่มของ osmotic pressure มักจะเกิดขึ้นน้อยมากประมาณ 0.2-0.8 MPa ยกเว้นในพืชที่มีการปรับตัวต่อสภาวะขาดน้ำที่รุนแรงในการปรับค่าออสโมติกนี้มีการเพิ่มขึ้นของ



สารประกอบต่างๆ ไปหลายชนิด เช่น น้ำตาล กรดอินทรีย์ และไอออนต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง  $K^+$  การปรับค่าออสโมติกสามารถรักษาแรงเต่งทำให้เซลล์สามารถขยายตัว และทำให้ปากใบยังสามารถเปิดได้ทั้งที่มีค่าศักย์ของน้ำต่ำ (Turner and Jones, 1980) การปรับค่าออสโมติกสามารถเพิ่มความทนทานต่อสภาวะขาดน้ำของพืชได้ แต่จะไม่มีผลต่อการสร้างผลผลิตของพืช (McCree and Richardson, 1987) นอกจากนี้เมื่อพืชตกอยู่ในสภาวะเครียดจะทำให้เกิดสารประกอบออกซิเจนที่ไวต่อปฏิกิริยา (reaction oxygen species; ROS) ได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion), ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) และอนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radical) (นุชนาฏ และคณะ, 2555) ซึ่งจะทำลายองค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ เช่น โปรตีนและดีเอ็นเอ สร้างความเสียหายให้กับพืช (Osakabe *et al.*, 2014) ส่งผลต่อสรีรวิทยาของพืช และการแสดงออกของยีน (ยุวดี, 2553) พืชจะมีระบบการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดจากการทำงานของสารต่างๆ ร่วมกัน เรียกว่า antioxidant ซึ่งเป็นสารที่ทำหน้าที่ยับยั้งหรือต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือเป็นสารที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระออกจากเซลล์ได้ เช่น เอนไซม์ superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, glutathione และ catalase เป็นต้น (Karpinski *et al.*, 1997) นอกจากนี้กิจกรรมของเอนไซม์หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง nitrate reductase, phenylalanine ammonialyase และอีกหลายชนิดลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อสภาวะขาดน้ำมีความรุนแรงเพิ่มขึ้น ส่วนเอนไซม์บางชนิด เช่น  $\alpha$ -amylase และ ribonuclease มีกิจกรรมเพิ่มขึ้น ซึ่ง hydrolytic enzymes จำพวกนี้สามารถย่อยโมเลกุลของแป้งและสารประกอบชนิดอื่นๆ ทำให้ค่า osmotic potential เป็นลบมากขึ้น หมายถึง พืชนั้นมีความสามารถในการต้านทานต่อสภาวะขาดน้ำได้ดี ระดับความรุนแรงของสภาวะขาดน้ำส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์เป็นผลให้เกิดการยับยั้งการแบ่งเซลล์ หลังจากนั้นปากใบจะเริ่มปิด ทำให้การคายน้ำและการสังเคราะห์แสงลดลง ส่งผลให้มีการสังเคราะห์กรดแอบไซซิกในเนื้อเยื่อใบเพิ่มขึ้นถึง 40 เท่า การเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดแอบไซซิกอาจจะมีการปิดปากใบในพืชจำพวก mesophyte เนื่องจากมีการทดลองพบว่า การเพิ่มขึ้นของกรดแอบไซซิกที่น้อยมากในพืชน้ำ พืชจำพวกนี้มีการเพิ่มขึ้นของกรดแอบไซซิกในระดับที่ต่ำมากผิดปกติ (Kriedemann and Loveys, 1974)

#### 4. กลไกการเปิด-ปิดปากใบที่ควบคุมโดยการเปลี่ยนแปลงแรงดันเต่ง

ปากใบ (stomata) เป็นโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนก๊าซเพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง การหายใจและ การคายน้ำ ตลอดจนการลำเลียงน้ำในพืชซึ่งพบได้ทุกส่วนของเนื้อเยื่อผิวของพืชในส่วนที่อยู่เหนือดิน แต่จะพบมากที่สุดที่ใบ ซึ่งปากใบเป็นโครงสร้างที่ประกอบด้วยส่วนสำคัญ คือ เซลล์คุม (guard cell) เป็นเซลล์สองเซลล์ที่อยู่เป็นคู่กันในชั้นเนื้อเยื่อผิว (epidermal layer) และช่องเปิดที่อยู่ระหว่างเซลล์คุมทั้งสอง (stomatal pore) (Esau, 1977)

การเปิดรับ  $\text{CO}_2$  เป็นหน้าที่สำคัญของปากใบ พืชโดยทั่วไปจะเปิดปากใบเมื่อมีแสงเพื่อรับ  $\text{CO}_2$  เพื่อใช้ในการสังเคราะห์แสง ซึ่งโดยปกติ  $\text{CO}_2$  ในอากาศมีความเข้มข้นสูงกว่าในใบเมื่อปากใบเปิด  $\text{CO}_2$  จึงแพร่เข้าสู่รูปากใบ แต่ในขณะเดียวกันน้ำก็แพร่ออกจากใบสู่อากาศภายนอกด้วยเช่นกัน จึงทำให้มีปริมาณน้ำสูงกว่าอากาศภายนอกใบ การแพร่เข้าของ  $\text{CO}_2$  และการแพร่ออกของน้ำทางปากใบนี้ เรียกว่า การสูญเสียน้ำทางปากใบหรือการคายน้ำ (transpiration) การสูญเสียน้ำทางปากใบหรือการคายน้ำ มีความสำคัญต่อพืชเป็นอย่างมาก เมื่อน้ำแพร่ออกทางปากใบจะทำให้เกิดแรงดันน้ำจากผิวใบไปจนถึงน้ำที่ผิวราก ซึ่งแรงดันนี้ทำให้พืชลำเลียงน้ำจากรากขึ้นไปยังส่วนยอดได้โดยไม่ต้องสูญเสียวงานมาก นอกจากนี้การคายน้ำทางปากใบเป็นการสูญเสียน้ำในรูปของไอน้ำซึ่งเป็นการเปลี่ยนสถานะของน้ำจากของเหลวให้กลายเป็นไอ การเปลี่ยนสถานะของน้ำนี้เกิดขึ้นโดยได้รับพลังงานความร้อนจากเซลล์ของใบ ดังนั้น การคายน้ำจึงช่วยลดอุณหภูมิของใบได้ซึ่งเป็นกลไกการควบคุมอุณหภูมิของใบให้คงที่ เนื่องจากเซลล์พืชประกอบไปด้วยน้ำเป็นส่วนใหญ่ การสูญเสียน้ำทางปากใบหากมีปริมาณมากจนเกินไปจะทำให้ไม่สมดุลกับปริมาณน้ำที่เข้ามาทางรากจึงส่งผลให้พืชขาดน้ำ สูญเสียความเต่งและเหี่ยวในที่สุด (อัญชลี, 2555)

การเปิดปากใบ หรือการเปลี่ยนแปลงของความกว้างของช่องเปิดปากใบเกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงแรงดันเต่งของเซลล์คุม กล่าวคือ ถ้าเซลล์คุมมีแรงดันเต่งมาก ช่องเปิดปากใบจะมีความกว้างมากขึ้นจึงทำให้ปากใบเปิด ถ้าเซลล์คุมมีแรงดันเต่งลดลงช่องเปิดของปากใบจะแคบลง ซึ่งถ้าแรงดันเต่งลดลงถึงระดับหนึ่ง ปากใบจะปิดสนิท โดยปกติแล้วปากใบจะเปิดเวลากลางวัน และปิดเวลากลางคืน มีพืชบางชนิดที่อาจเกิดสลับกันเช่นพืชในทะเลทราย เปิดปากใบเวลากลางคืนเพื่อตรึง  $\text{CO}_2$  และปิดปากในเวลากลางวันเพื่อลดการสูญเสียน้ำ ปัจจัยหลักที่มีผลโดยตรงต่อการปิดเปิดปากใบ คือ ปริมาณ  $\text{CO}_2$  ความชื้นและแสง ซึ่งปากใบของพืชส่วนใหญ่มีความไวต่อความชื้นในอากาศมาก โดยจะปิดปากใบเมื่อมีปริมาณน้ำในอากาศมากกว่าปริมาณไอน้ำในช่องว่างระหว่างเซลล์เกินระดับวิกฤต (critical level) แต่ผลการตอบสนองต่อความชื้นนี้จะได้รับ

อิทธิพลจากปริมาณ CO<sub>2</sub> ภายในช่องว่างระหว่างเซลล์ด้วย ถ้าปริมาณ CO<sub>2</sub> ลดลงมาก แม้ความชื้นในอากาศจะสูงก็สามารถทำให้ปากใบเปิดได้อีก (Hopkins, 1995) การปิดเปิดปากใบขึ้นกับความแตกต่างของเซลล์คุม ดังนั้นหากมีปัจจัยทางกายภาพภายนอกต้นพืชที่มีผลทำให้เซลล์คุมสูญเสียแรงดันเต่งปากใบจะปิด เช่น ในกรณีที่มีความชื้นในอากาศน้อย ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากอุณหภูมิสูงหรือลมแรง เซลล์คุมจะสูญเสียน้ำในรูปของการระเหยทำให้สูญเสียแรงดันเต่งของเซลล์คุม ส่งผลให้ปากใบปิด นอกจากนี้ในสภาวะที่พืชขาดน้ำจะมีกลไกภายในโดยอาศัยอิทธิพลของฮอร์โมน abscisic acid กระตุ้นให้ปากใบปิด (Taiz and Zeiger, 1991)

การตอบสนองของปากใบต่อการสูญเสียน้ำจะมีลักษณะที่แตกต่างกันไปทั้งในพืชชนิดเดียวกันและต่างชนิดกัน ปากใบของพืชบางชนิดที่เป็นพวก dehydration-postponing species เช่น พืช cowpea และมันสำปะหลัง จะมีการตอบสนองต่อการขาดน้ำมากกว่าปกติ ทำให้การเปิดปากใบ และการคายน้ำลดลงมากจนทำให้ค่าศักย์ของน้ำในใบแทบจะไม่มีเปลี่ยนแปลง (Radin and Hendrix, 1988)

## 5. บทบาทของฮอร์โมนพืชในสภาวะขาดน้ำ

ภายใต้สภาวะขาดน้ำ ฮอร์โมนพืชที่มีบทบาทต่อการตอบสนองทางสรีรวิทยาของพืชซึ่งฮอร์โมนพืชที่มีผลโดยตรงต่อการตอบสนองทางสรีรวิทยาในสภาวะขาดน้ำ คือ กรดแอบไซซิกซึ่งมีผลทำให้มีการปิดปากใบเพื่อลดการสูญเสียน้ำ นอกจากนี้ยังพบว่า มีฮอร์โมนอื่นๆ ที่มีบทบาท ได้แก่ ไซโตไคนิน (cytokinin) ช่วยชะลอการแก่และร่วงของใบ แต่เมื่อพืชขาดน้ำจะมีผลทำให้การสร้างไซโตไคนิน จากรากมีปริมาณลดลงส่งผลต่อการปิดของปากใบ เพราะการปิดเปิดของปากใบขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของ abscisic acid/cytokinin เมื่ออัตราส่วนนี้มีค่าสูงขึ้นจะส่งผลให้พืชมีการปิดของปากใบ นอกจากนี้ยังพบว่า พืชมีการสร้างเอทิลีนเพิ่มขึ้นในการตอบสนองต่อสภาวะเครียดหลายอย่าง เช่น สภาวะน้ำท่วมขัง โรคพืชมดพิษ (Salisbury and Ross, 1978) และยังพบว่า สภาวะขาดน้ำของพืชมีผลชักนำให้เกิดการสังเคราะห์เอทิลีน ซึ่งทำให้เกิดการแก่และร่วงของใบเร็วขึ้น นอกจากนี้สภาวะขาดน้ำของพืชมีผลทำให้ปฏิกิริยาของจิบเบอเรลลิน (gibberellin) ในใบพืชลดลง และทำให้การแพร่กระจายของฮอร์โมน IAA (indoleacetic acid) ลดลงด้วยเช่นกัน ดังนั้นจึงมีผลทำให้เกิดการแก่ และร่วงของใบ ซึ่งส่งผลให้พื้นที่ใบลดลง (เอ็จ, 2554)

## 6. บทบาทของกรดแอบไซซิกในสภาวะขาดน้ำ

ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ภูมิอากาศหนาวเย็น สภาวะเค็ม และสภาวะขาดน้ำ พืชจะมีการตอบสนองโดยมีการควบคุมการเปิด-ปิดปากใบซึ่งเกี่ยวกับปริมาณของน้ำที่รากพืชดูดน้ำเข้าไปไม่ทันกับการระเหยออกทางปากใบ ถึงแม้ว่าในดินจะมีมากพอ แต่ถ้ารากดูดน้ำไม่ทันจะทำให้เกิดฟองอากาศขึ้นในท่อไซเลม (xylem) ส่งผลให้กรดแอบไซซิกในใบเพิ่มมากขึ้น จากภาวะปกติกว่า 50 เท่า และมีผลให้เกิดการปิดปากใบ (stomatal closing) เพื่อลดการสูญเสียน้ำจากการคายน้ำ กรดแอบไซซิกที่เพิ่มขึ้นนี้ เกิดจากการสังเคราะห์มากขึ้นที่ใบและการลำเลียงมาจากเนื้อเยื่อบริเวณราก นอกจากการปิดปากใบมากขึ้นเพื่อลดการสูญเสียน้ำทางปากใบแล้ว การมีกรดแอบไซซิกเพิ่มขึ้นยังมีผลต่อรูปแบบการเจริญเติบโตของพืชที่เปลี่ยนแปลงไป เพื่อให้เหมาะสมกับสภาวะที่พืชได้รับน้ำน้อย ได้แก่ การเพิ่มการเจริญเติบโตของส่วนรากและลดการเจริญเติบโตของส่วนลำต้นเหนือดิน ปริมาณรากที่เพิ่มมากขึ้นจะช่วยให้พืชสามารถดูดน้ำได้มากขึ้น การชะลอการเจริญเติบโตของส่วนลำต้นเหนือดินเป็นเพียงการประหยัดพลังงานเพื่อนำมาใช้ในกระบวนการสร้างราก (เอ็จ, 2554) สัญญาณจากระบบรากมีผลต่อการตอบสนองของปากใบในสภาวะขาดน้ำของพืช โดยพืชจะมี stomatal conductance สัมพันธ์กับระดับน้ำในดินมากกว่าระดับน้ำในใบ และส่วนของพืชที่จะได้รับผลกระทบโดยตรงก็คือส่วนรากเท่านั้น ซึ่งอาจจะมีเพียงบางส่วนของรากที่ได้รับการขาดน้ำก็สามารถกระตุ้นให้ปากใบปิดได้ ถึงแม้ว่าส่วนของรากที่เหลือยังได้รับน้ำตามปกติและสามารถลำเลียงน้ำไปยังลำต้นได้ในปริมาณที่เพียงพอ กรดแอบไซซิกเป็นองค์ประกอบสำคัญของพืช ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่กระตุ้นการปิดของปากใบ เพื่อลดการคายน้ำของพืช และยังช่วยลดศักย์ของน้ำในใบของพืชภายใต้สภาวะแล้ง (Borel *et al.*, 1997) เมื่อทดลองปลูกข้าวโพด (*Zea mays*) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนของรากที่ได้รับน้ำปกติ และส่วนของรากที่งดการให้น้ำ พบว่าปากใบเริ่มปิด และค่าศักย์ของน้ำในใบเพิ่มขึ้น (Blackman and Davies, 1985) ในสภาวะขาดน้ำรากมีการสร้างกรดแอบไซซิกและส่งไปยังท่อน้ำเลี้ยง ซึ่งมีการทดลองปลูก dayflower (*Commelina communis*) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน คือ ปลูกในกระถางที่ให้น้ำปกติ และปลูกในกระถางที่ทำการงดน้ำ พบว่า ปริมาณกรดแอบไซซิกของรากที่ทำการงดการให้น้ำมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นอย่างมาก (Zhang *et al.*, 1987) เช่นเดียวกับการศึกษาในถั่วที่มีการสะสมของกรดแอบไซซิกเพิ่มขึ้น เมื่อได้รับสภาวะเครียดน้ำ (Qin and Zeevaart, 1999) การศึกษาในฝ้าย (*Gossypium hirsutum*) มีปัจจัยบางอย่าง เช่น การให้ปุ๋ยไนโตรเจนมีผลต่อการสะสมหรือการเคลื่อนย้ายของกรดแอบไซซิก ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมากในการตอบสนองของปากใบ

ต่อสภาวะขาดน้ำ (Radin and Hendrix, 1988) ความแตกต่างทางพันธุกรรมในการทนต่อสภาวะแล้ง มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกรดแอบไซซิกและความไวต่อสภาวะแล้งของพืชหลายชนิด (Blum and Sinmena, 1995) พืชที่มีความไวต่อสภาวะแล้งจะมีการสะสมปริมาณกรดแอบไซซิกในระดับที่สูงกว่าพืชที่สามารถทนต่อสภาวะแล้งได้ อย่างเช่น ข้าวโพด (*Zea mays* L.) (Ilahi and Dorffling, 1982), ข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L. Em. Thell.) (Quarrie and Jones, 1979; Quarrie, 1980; 1981) และข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* L. Moench.) (Durley *et al.*, 1983) ในทางตรงกันข้ามปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกในใบนั้นมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความต้านทานต่อสภาวะแล้งในถั่วเหลือง (*Glycine max* L. Merr.) (Samet *et al.*, 1980) และลูกเดือย (*Pennisetum americanum* L.) (Henson *et al.*, 1981)

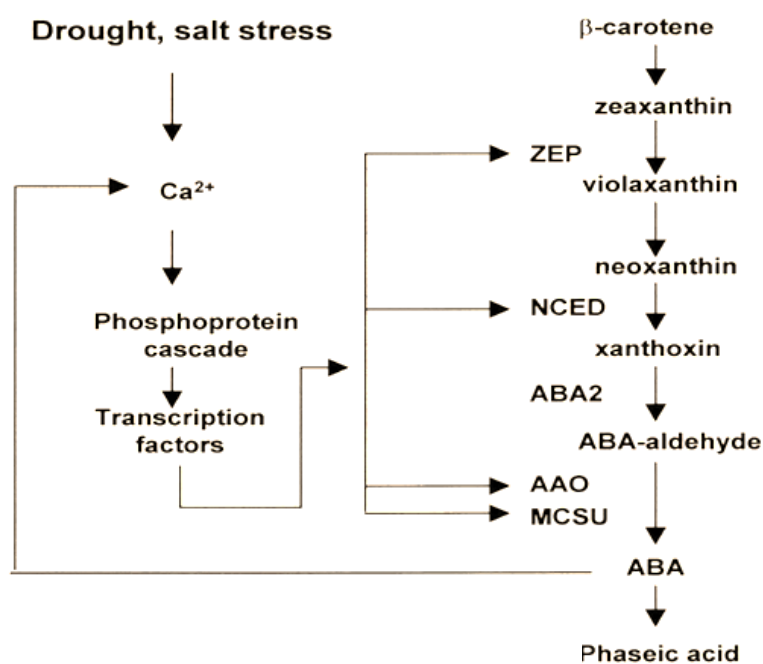
## 7. กระบวนการสังเคราะห์กรดแอบไซซิก

กรดแอบไซซิกเป็นฮอร์โมนที่มีบทบาทโดยตรงต่อการตอบสนองทางสรีรวิทยาของพืชในสภาวะขาดน้ำ กรดแอบไซซิกเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอน 15 อะตอมและเป็นเซสควิเทอร์พีนอยด์ (sesquiterpenoids) ดังนั้นจึงสังเคราะห์จากสารเทอร์พีนอยด์ โดยเริ่มสังเคราะห์จากกรดเมวาโลนิค (mevalonic acid pathway) เปลี่ยนไปจนเป็นฟาร์นิซิล ไพโรฟอสเฟต (farnesyl pyrophosphate) แคลโรทีนอยด์ที่มีคาร์บอน 40 อะตอม เช่น ไวโอลาแซนทิน (violaxanthin) สามารถถูกออกซิไดซ์โดยการใช้ออกซิเจนเกิดเป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับกรดแอบไซซิก และถูกออกซิไดซ์จนกลายเป็นกรดแอบไซซิก ซึ่งจะถูกระตุ้นให้สังเคราะห์มากขึ้นเมื่อขาดน้ำ โดยการสังเคราะห์เกิดในคลอโรพลาสต์ ดังนั้น ใบลำต้น และผลไม้เขียวจึงสามารถสังเคราะห์กรดแอบไซซิกได้ การสังเคราะห์กรดแอบไซซิกจะเกิดขึ้นในพลาสติด (plastid) โดยใช้ไวโอลาแซนทิน (violaxanthin) จากกระบวนการสังเคราะห์แคลโรทีนอยด์เป็นสารตั้งต้น โดยไวโอลาแซนทินจะถูก oxidative cleavage เป็นสารคาร์บอน 15 อะตอมที่มีชื่อว่าแซนโทซิน (xanthoxin) ด้วยเอนไซม์ NCED (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase) ซึ่งควบคุมด้วยยีน *NCED* ดังแสดงในภาพที่ 2 หลังจากนั้นสารแซนโทซิน จะถูกส่งไปยังไซโทซอล (cytosol) และจะถูกแปลงเป็น abscisic aldehyde ด้วยเอนไซม์ short-chain alcohol dehydrogenase/reductase (SDR) ซึ่งควบคุมด้วยยีน *ABA2* หลังจากนั้นเอนไซม์ ABA aldehyde oxidase (AAO) จะคาตาไลซ์ (catalyzes) abscisic aldehyde ให้เป็นกรดแอบไซซิก (Xiong and Zhu, 2003) เมื่อพืชอยู่ในสภาวะขาดน้ำ กรดแอบไซซิกจะถูกสังเคราะห์ขึ้นบริเวณรากและส่งผ่านท่อน้ำไปยังใบเพื่อควบคุมการทำงานของปากใบ กระบวนการเมตาบอลิซึมเกิดขึ้นกับกรดแอบไซซิกได้ 2 ทาง คือ

กรดแอบไซซิกอาจเปลี่ยนรูปไปเป็น abscisyl- $\beta$ -D-glucopuranoside ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่สามารถย้อนกลับได้ หรืออาจจะเปลี่ยนรูปเป็น 6'-hydroxymethyl ABA, phaseic acid หรือ 4'-dihydrophaseic acid ซึ่งจะเป็นรูปที่ไม่สามารถย้อนกลับไปเป็นกรดแอบไซซิกได้อีก นอกจากนี้กรดแอบไซซิกสามารถอยู่ในรูปที่ไม่ออกฤทธิ์โดยการจับกับ glucose ที่ carboxyl group ของกรดแอบไซซิกแล้วเปลี่ยนรูปเป็น ABA-glucose ester โดยระดับของกรดแอบไซซิกภายในต้นพืชจะมีปริมาณมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญเติบโต และสภาพแวดล้อมภายนอกที่ทำให้พืชอยู่ในสภาวะเครียด โดยในสภาวะขาดน้ำปริมาณของกรดแอบไซซิกในต้นพืชจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับค่าศักย์ของน้ำในใบพืช ปริมาณกรดแอบไซซิกในต้น *Ambrosia artemisifolia* จะเพิ่มขึ้นทันที เมื่อใบพืชชนิดนี้มีค่าศักย์ของน้ำ เท่ากับ -10 บาร์ ส่วนในข้าวโพดจะอยู่ที่ -12 บาร์ ส่วนในถั่วปริมาณกรดแอบไซซิกจะสูงขึ้นเมื่อศักย์ของน้ำ มีค่าเท่ากับ -7 บาร์ สภาวะขาดน้ำทำให้เยื่อหุ้มคลอโรพลาสต์มีคุณสมบัติ permeability เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของกรดแอบไซซิกจากคลอโรพลาสต์ซึ่งเป็นบริเวณที่สะสมกรดแอบไซซิกของใบพืชปกติ การลดปริมาณของกรดแอบไซซิกในคลอโรพลาสต์จะกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์กรดแอบไซซิกเพิ่มขึ้น เมื่อพืชได้รับน้ำเยื่อหุ้มคลอโรพลาสต์จะไม่ยอมให้กรดแอบไซซิกรั่วไหลออกมา ทำให้เกิดการหยุดสังเคราะห์กรดแอบไซซิกในคลอโรพลาสต์ ซึ่งเป็น feedback mechanism การทำงานของกรดแอบไซซิกจะกระตุ้นให้เกิดการปิดของปากใบ และระงับการผ่านของ  $K^+$  เข้าสู่เซลล์คุม และกระตุ้นให้ malate รั่วไหลออกจากเซลล์คุม และนอกจากนั้นกรดแอบไซซิกยังระงับการแลกเปลี่ยนประจุ  $H^+$  และ  $K^+$  ของเซลล์คุม ทำให้ปริมาณของ  $K^+$  และ malate ในเซลล์คุมมีน้อย ส่งผลให้ค่าศักย์ของน้ำสูงขึ้น น้ำจึงไหลออกจากเซลล์คุม ทำให้ปากใบปิดได้ (เอ็จ, 2554)

Khodambashi และคณะ (2013) ศึกษาการแสดงออกของยีน *NCED* ภายใต้สภาวะขาดน้ำ ในระยะการเจริญเติบโตทางด้านลำต้นและระยะการติดดอกของถั่วในพันธุ์ที่แตกต่างกันพบว่า การแสดงออกของยีน *NCED* ในใบของถั่วพันธุ์ต่าง ๆ มีการตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำในระยะการเจริญเติบโตทางด้านลำต้น โดยถั่วพันธุ์ KS-21486, KS-21191 and Goynok98 มีการแสดงออกของยีน *NCED* ในใบเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะขาดน้ำ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 12, 8 และ 17 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับใบถั่วในชุดควบคุม ตามลำดับ นอกจากนี้ในระยะที่เริ่มติดดอก มีการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *NCED* ในตาดอกและในใบ พบว่า เมื่ออยู่ในสภาวะขาดน้ำ ตาดอกของถั่วมีค่าสูงกว่าในใบทั้งสภาวะควบคุมและสภาวะขาดน้ำ นอกจากนี้ Zhang และคณะ (2015) ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *NCED* ในต้นกล้าของสบู่ดำอายุ 8 สัปดาห์ โดยศึกษาในรากสบู่ดำ ด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR (qRT-PCR) พบว่า หลังจากทำการรดน้ำในต้นกล้าของสบู่ดำเป็นเวลา 1, 4 และ 7 วัน พบว่า มีการแสดงออกของยีน *NCED3* และ *NCED5* เพิ่มมากขึ้นในรากของสบู่ดำ

เช่นเดียวกับฮาโวคาโตที่มีการรดน้ำจนใบเหี่ยว พบปริมาณกรดแอบไซซิกเพิ่มสูงขึ้น 10 เท่า เมื่อเทียบกับใบปกติ และมีการแสดงออกของยีน *NCED1* และ *NCED2* สูง แต่ไม่พบการแสดงออกของยีน *NCED3* (Chernys and Zeevaart, 2000)



ภาพที่ 2 กระบวนการสังเคราะห์กรดแอบไซซิก

ที่มา : Osakabe และคณะ (2014)

ในพืชที่มีการตัดต่อยีน *NCED* ซึ่งเป็นยีนในกระบวนการสังเคราะห์กรดแอบไซซิก พบว่า สามารถทำให้พืชทนทานต่อสภาวะขาดน้ำได้ดีขึ้น เช่น Estrada-Melo และคณะ (2015) ศึกษาการตัดต่อยีน *NCED* จากมะเขือเทศ เพื่อนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชมะเขือเทศให้มีความทนทานต่อสภาวะขาดน้ำ โดยใช้ rd29A เป็น promoter เพื่อควบคุมการทำงานของยีน *NCED* เมื่อทำการรดน้ำเป็นเวลา 7 วัน ในพืชมะเขือเทศที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน *NCED* (ชุดควบคุม) จะแสดงอาการเหี่ยวเมื่อเวลาผ่านไปเพียงแค่ 3 วัน ส่วนพืชมะเขือเทศที่มีการตัดต่อยีน *NCED* จะแสดงอาการเหี่ยวในวันที่ 10 ของการรดน้ำ หลังจากงดน้ำเป็นเวลา 14 วัน แล้วมีการให้น้ำอีกครั้ง พบว่า พืชมะเขือเทศที่ไม่ตัดต่อยีน *NCED* จะมีอัตราการรอดชีวิตเพียงแค่ 11 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่พืชมะเขือเทศที่มีการตัดต่อยีน *NCED* จะมีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 94.4 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ การตัดต่อยีน *NCED3* ใน *arabidopsis* จะทำให้ *arabidopsis* มีการสะสมกรดแอบไซซิก ในปริมาณที่สูงขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะขาดน้ำ (Luchi *et al.*, 2001);

(Wan and Li., 2006) เช่นเดียวกับการตัดต่อยีน *NCED1* ในมะเขือเทศ (Thompson *et al.*, 2000) ดังนั้นการศึกษากายแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสะสมกรดแอบไซซิก ประกอบกับการเก็บข้อมูลการตอบสนองทางสรีรวิทยาที่เกี่ยวข้อง จึงมีความสำคัญที่จะสามารถนำมาใช้เป็นดัชนีในการคัดเลือกพันธุ์ต้นกล้าของพาราที่มีศักยภาพในการทนทานต่อสภาวะขาดน้ำได้

### 3. วัตถุประสงค์

- 3.1 เพื่อศึกษากายการตอบสนองทางสรีรวิทยาของต้นกล้าของพาราแต่ละพันธุ์ในสภาวะขาดน้ำ
- 3.2 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED)* กับการสะสมปริมาณของกรดแอบไซซิกในต้นกล้าของพาราพันธุ์ต่างๆ ในสภาวะขาดน้ำ
- 3.3 เพื่อคัดเลือกพันธุ์ต้นกล้าของพาราที่มีศักยภาพในการทนทานต่อสภาวะขาดน้ำเพื่อใช้เป็นต้นตอ



## บทที่ 2

### วิธีการวิจัย

#### วัสดุและอุปกรณ์

##### 1. วัสดุพืช

ทำการเตรียมต้นกล้ายางพาราโดยการเก็บรวบรวมเมล็ดยางพารา 6 พันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยการนำเมล็ดยางพาราแต่ละพันธุ์เพาะในกระถางขนาด 12 นิ้ว เมื่อต้นกล้ายางพาราอายุประมาณ 3-4 เดือน คัดเลือกต้นกล้าที่มีลักษณะแข็งแรง โดยขนาดของลำต้นมีเส้นผ่านศูนย์กลางไม่น้อยกว่า 1 เซนติเมตร วัดที่ระดับความสูงจากพื้นดิน 10 เซนติเมตร มีลำต้นตั้งตรง และมีจำนวนใบอย่างน้อย 3 คู่

ตารางที่ 1 ชื่อพันธุ์ของต้นกล้ายางพารา และสถานที่เก็บเมล็ดพันธุ์ยางพาราที่ใช้ในการทดลอง

พันธุ์ยางพารา	พื้นที่ในการเก็บเมล็ดยางพารา
RRIT 408	ศูนย์วิจัยยางจังหวัดสุราษฎร์ธานี
RRIT 251	แปลงเกษตรกรจังหวัดสุราษฎร์ธานี
PB 5/51	แปลงเกษตรกรจังหวัดสุราษฎร์ธานี
RRIM 600	แปลงเกษตรกรจังหวัดสุราษฎร์ธานี
RRIM 623	แปลงเกษตรกรจังหวัดตรัง
BPM 24	แปลงเกษตรกรจังหวัดตรัง

##### 2. สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์สำหรับการโคลนนิ่ง NCED3

###### 2.1 เชื้อแบคทีเรียเซลล์เจ้าบ้าน

เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  สำหรับเพิ่มปริมาณของพลาสมิดลูกผสม

## 2.2 พลาสมิดสำหรับการโคลนยีน *NCED3*

พลาสมิด RBC TA cloning vector (RBC Bioscience, ใต้หวัน) ประกอบด้วย โปรโมเตอร์ T7 ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *LacZ* และตำแหน่งต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน มีตำแหน่งตัดกับเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ multiple cloning region

## 2.3 สารเคมีที่ใช้ในการโคลนยีน *NCED3*

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

## 2.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการโคลนยีน *NCED3*

- 1) เครื่อง Thermo cycler (Analytik Jena, Germany)
- 2) เครื่อง PCR gradient (BIO-RAD, USA)
- 3) เครื่อง Centrifuge 4 องศาเซลเซียส (Hettich, Germany)
- 4) เครื่อง Electrophoresis (Mupid, Japan)
- 5) เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (Mettler Toledo, USA)
- 6) เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius, Thailand)
- 7) เครื่องกรองสาร (DAIHAN Scientific, Korea)

- 8) หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml (Sorenson BioScience, USA)
- 9) หลอด microcentrifuge ขนาด 500  $\mu$ l (Sorenson BioScience, USA)
- 10) หลอด PCR ขนาด 200  $\mu$ l (Sorenson BioScience, USA)
- 11) ตู้ laminar air flow (Microtech, India)
- 12) ตู้ hot air oven (Mettler, Germany)
- 13) ขวดรูปชมพู่ ขนาด 50, 250 และ 500 ml. (SciLabware, UK)
- 14) จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (SciLabware, UK)
- 15) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (Autoclave) (Tomy, Japan)
- 16) ไมโครเวฟ (Electrolux, Thailand)
- 17) Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad, USA)
- 18) Incubator shaking (Labtech, England)
- 19) Pipettes P2, P20, P200, P1000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 20) Pipettes tips (Greinerbio-one, Austria)
- 21) Water bath (Mettler, Germany)

### 3. สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์สำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอ

#### 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอ

- 1) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (Merck Millipore, Germany)
- 2) ไนโตรเจนเหลว
- 3) Absolute ethanol (J.T. Baker, USA)
- 4)  $\beta$ - mercaptoethanol (Bio Basic, Canada)
- 5) Chloroform (RCL Labscan, Thailand)
- 6) Diethylpyrocarbonate (DEPC) (Panreac AppliChem, Spain)
- 7) Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA)  
(Bio Basic, Canada)
- 8) Isoamyl alcohol (J.T. Baker, USA)
- 9) Lithium chloride (LiCl) (Fisher Scientific, UK)
- 10) Polyvinyl polypyrrolidone (PVPP) (Sigma-Aldrich, China)

- 11) Phenol, Saturated (Amreco, USA)
- 12) Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Merck, Germany)
- 13) Sodium acetate (NaAC) (Ajax Finechem, Australia)
- 14) Tris-HCl (Bio Basic, Canada)

### 3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอ

- 1) หลอด screw cap (Neptune, USA)
- 2) หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml (Sorenson BioScience, USA)
- 3) โกร่งบดตัวอย่าง
- 4) เครื่อง Centrifuge 4 องศาเซลเซียส (Hettich, Germany)
- 5) ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส (Panasonic, Thailand)
- 6) Gel Doc<sup>TM</sup> EZ Imager (Bio-Rad, USA)
- 7) Pipettes P2, P20, P200, P1000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 8) Pipettes tips (Greinerbio-one, Austria)

## 4. สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์สำหรับสังเคราะห์ Complementary DNA (cDNA)

### 4.1 สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ Complementary DNA (cDNA)

- 1) Diethylpyrocarbonate (DEPC) (Panreac AppliChem, Spain)
- 2) Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)

### 4.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ Complementary DNA (cDNA)

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

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

### 5.1 สารเคมีที่ใช้ในการทำ qRT-PCR

- 1) Eva<sup>®</sup> Green Super Mix (Bio-Rad, USA)
- 2) Diethylpyrocarbonate (DEPC) (Panreac AppliChem, Spain)

### 5.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำ qRT-PCR

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

## 6. สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณการสะสมกรดแอมไชนิก

### 6.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณการสะสมกรดแอมไชนิก

- 1) Methanol (J.T. Baker, Canada)
- 2) Butylated hydroxytoluene (BHT) (Sigma – Aldrich, USA)
- 3) Citric acid (Sigma – Aldrich, USA)
- 4) Distilled water
- 5) Hormone standard strips, ABA
- 6) ABA-tracer, alkaline phosphatase
- 7) TBS buffer
- 8) PNP substrate tablets
- 9) PBST wash buffer
- 10) Substrate diluent
- 11) Sodium azide (Ajax, Australia)

## 6.2 อุปกรณ์ที่ใช้ สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิก

- 1) Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridges (Millipore)
- 2) Disposable syringes 3 ml
- 3) ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส (Panasonic, Thailand)
- 4) ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส (Panasonic, Thailand)
- 5) ตู้ Incubator 37 องศาเซลเซียส
- 6) หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml (Sorenson BioScience, USA)
- 7) หลอด polypropylene test tubes ขนาด 15 ml (Spllifesciences, Korea)
- 8) หลอด polypropylene test tubes ขนาด 50 ml (Spllifesciences, Korea)
- 9) บีกเกอร์ ขนาด 100, 250, 500, 1000 ml (SciLabware, UK)
- 10) เครื่อง Freeze-dry (lyophilize)
- 11) เครื่อง Sonicator (Comcube, Thailand)
- 12) เครื่อง Homogenizer (IKA scientifica, Germany)
- 13) เครื่อง Speed-Vac Concentrator
- 14) เครื่อง Centrifuge 4 องศาเซลเซียส (Helttich, Germany)
- 15) เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius, Thailand)
- 16) เครื่อง Vortex
- 17) เครื่อง Microplate Redder (PowerWaveX, Biotek)
- 18) ไนโตรเจนเหลว
- 19) Pipettes P2, P20, P200, P1000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 20) Pipettes tips (Greinerbio-one, Austria)
- 21) Aluminum foil
- 22) Airtight box
- 23) Anti - ABA coated testwells
- 24) Plate sealer

## 7. สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์สำหรับการทดสอบการตอบสนองของปากใบของพาราด์ออกกรดแอบไซซิก

### 7.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับการทดสอบการตอบสนองของปากใบของพาราด์ออกกรดแอบไซซิก

- 1) Abscisic acid (Sigma – Aldrich, USA)
- 2) Distilled water
- 3) Iminodiacetic acid (Sigma – Aldrich, USA)
- 4) Potassium chloride (Ajax Finechem, Australia)
- 5) Potassium hydroxide Pellet (J.T. Baker, Malaysia)
- 6) MES hydrate (Sigma – Aldrich, USA)

### 7.2 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการทดสอบการตอบสนองของปากใบของพาราด์ออกกรดแอบไซซิก

- 1) กล้องจุลทรรศน์ Leica DM750 กำลังขยาย 100 เท่า
- 2) ขวดรูปชมพู่ ขนาด 50, 250, 500, 1000 ml (SciLabware, UK)
- 3) เครื่องกวนสาร (DAIHAN Scientific, Korea)
- 4) เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius, Thailand)
- 5) เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (Mettler Toledo, USA)
- 6) ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส (Panasonic, Thailand)
- 7) ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส (Panasonic, Thailand)
- 8) บีกเกอร์ ขนาด 100, 250, 500, 1000 ml (SciLabware, UK)
- 9) แผ่นสไลด์ และกระจกปิดสไลด์
- 10) Aluminum foil
- 11) Pipettes P2, P20, P200, P1000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 12) Pipettes tips (Greinerbio-one, Austria)

## 8. เครื่องมือทางสรีรวิทยา

8.1 Data logger, DT-172

8.2 Moisture Meter รุ่น HH2+WET Sensor ยี่ห้อ Delta-T Device

8.3 Mettler Toledo™ FE30 FiveEasy™ Benchtop Conductivity Meters

8.4 MultispeQ V.1, PhotosynQ

### วิธีการดำเนินงาน

ทำการศึกษาด้านกล้าอย่างพารา 6 พันธุ์ ได้แก่ PB 5/51, RRIT 251, RRIM 623, RRIM 600, RRIT 408 และ BPM 24 ที่มีอายุ 6 เดือน ซึ่งได้จากการเพาะเมล็ด ด้วยวัสดุปลูกอย่างดินร่วนปนทราย บรรจุในกระถางพลาสติกขนาด 12 นิ้ว จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ต้น วางปลูกในสภาพโรงเรือน ทำการให้น้ำทุกวัน วันละ 2 ครั้ง เข้า-เย็น ตลอดระยะเวลาการเตรียมต้นกล้า หลังจากนั้นทำการรดน้ำเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตามลำดับ บันทึกข้อมูลและเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ดังนี้

### 1. การเก็บข้อมูลอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ และความชื้นดิน ภายใต้สภาวะโรงเรือน

บันทึกอุณหภูมิ และความชื้นอากาศภายในโรงเรือนที่ทำการทดลอง ด้วยเครื่อง Data logger รุ่น DT-172 โดยบันทึกข้อมูลตลอดช่วงการทดลอง เป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน

บันทึกปริมาณความชื้นในดิน (Soil moisture content) ด้วยเครื่องมือวัดความชื้นดิน Moisture Meter รุ่น HH2+WET Sensor ยี่ห้อ Delta-T Device ทำการวัดโดยเสียบหัววัดความชื้นดิน รุ่น WET Sensor ลงในดินความลึก 10 เซนติเมตร จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ตำแหน่ง ทำการวัดจากตัวอย่างไปในระยะเพลลาด ที่ทำการรดน้ำ เป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน



## 2. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นกล้ายางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำ

บันทึกภาพต้นกล้ายางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำ จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ต้น สังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นกล้ายางพารา โดยการให้คะแนนระดับความเหี่ยว และอัตราการรอดชีวิตของต้นกล้ายางพาราในทุกช่วงการงดน้ำ ได้แก่ 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตามลำดับ (ภาพที่ 3) เพื่อเปรียบเทียบพันธุ์ที่สามารถทนทานและไวต่อสภาวะขาดน้ำ โดยประเมินจากลักษณะทางกายภาพที่ปรากฏโดยให้คะแนนดังนี้

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



1

2

3

4

5

ภาพที่ 3 ระดับการประเมินลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นกล้ายางพารา

## 3. การศึกษาการตอบสนองทางสรีรวิทยาของต้นกล้ายางพารา ภายใต้สภาวะขาดน้ำ

### 3.1. การศึกษาปริมาณน้ำสัมพัทธ์ (relative water content; RWC)

ทำการคัดเลือกต้นกล้ายางพาราแต่ละพันธุ์ เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของปริมาณน้ำสัมพัทธ์ (Wang, 2014) โดยทำการงดน้ำต้นกล้าเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9, และ 11 วัน ตามลำดับ ศึกษาปริมาณน้ำสัมพัทธ์โดยการเก็บตัวอย่างใบ จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ต้น ทำการชั่งน้ำหนักสด

(fresh weight; FW) โดยตัดชิ้นส่วนใบเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาด 1 ตารางเซนติเมตร จำนวน 3 ชิ้น ใส่ในหลอดทดลอง ปิดฝาให้สนิท และทำการชั่งน้ำหนักสดอย่างรวดเร็ว จากนั้นเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วนำไปวางไว้ในห้องเย็น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ใบยางพาราดูดน้ำ ได้อย่างเต็มที่ จากนั้นใช้ปากคีบชิ้นส่วนใบวางลงบนกระดาษทิชชูเพื่อซับน้ำที่ผิวใบออก นำไป ชั่งหาน้ำหนักเต่ง (turgid weight; TW) จากนั้นนำชิ้นส่วนใบไปอบให้แห้งในตู้อบเป่าลมร้อนที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปชั่งหาน้ำหนักแห้ง (dry weight; DW) คำนวณหาปริมาณน้ำสัมพัทธ์ (RWC) จากสูตร

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

โดย	FW (fresh weight)	คือ น้ำหนักสดของพืช (กรัม)
	TW (turgid weight)	คือ น้ำหนักพืชที่เต่งตัวเต็มที่ (กรัม)
	DW (dry weight)	คือ น้ำหนักแห้งของพืช (กรัม)

### 3.2 การวัดค่าการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ (electrolyte Leakage; EL)

ศึกษาการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ (นิสาชล และคณะ, 2555) โดยการวัด ตัวอย่างใบที่มีระยะเพสลาด ซึ่งวัดจากใบที่ทำการรดน้ำเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตามลำดับ โดยใช้ตัวอย่างใบ จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ต้น ล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น ทำการตัด ตัวอย่างใบขนาด 1 ตารางเซนติเมตร จำนวน 4 ชิ้น ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นปราศจาก ไอออน ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำมาวัดค่าการนำไฟฟ้า ด้วยเครื่อง electrical conductivity meter จะได้ค่า EC1 จากนั้นนำหลอดทดลองไปให้ความร้อน โดยการใช้เครื่อง autoclave ที่ตั้งไว้ให้เย็น เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าการนำไฟฟ้าอีกครั้ง จะได้ค่า EC2 นำค่าทั้งสองมา คำนวณหาร้อยละการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ จากสูตร

$$\text{Electrolyte leakage } (\%) = \frac{(EC1)}{(EC2)} \times 100$$

### 3.3 ประสิทธิภาพการให้แสง (maximum quantum efficiency of photosystem II, $F_v/F_m$ )

บันทึกค่าประสิทธิภาพการให้แสงของใบยางพาราโดยใช้เครื่อง MultispeQ V.1 โดยสุ่มวัดใบในระยะเพลสลาตของยางพารา จำนวน 3 ต้น ต้นละ 3 ใบ ใบละ 3 ค่า ค่าที่ได้จากเครื่องมือเป็นค่า  $F_v/F_m$  อยู่ในช่วง 0 - 0.82 ซึ่งบ่งบอกถึงประสิทธิภาพการทำงานของ photosystem II ในกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช

### 3.4 ปริมาณคลอโรฟิลล์สัมพัทธ์ (relative chlorophyll content)

บันทึกค่าปริมาณคลอโรฟิลล์ โดยสุ่มวัดใบในระยะเพลสลาตของยางพารา จำนวน 3 ต้น ต้นละ 3 ใบ ใบละ 3 ค่า ค่าที่ได้จากเป็นค่า relative chlorophyll content บ่งบอกถึงปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบพืช

## 4. การโคลนยีน *NCED3*

### 4.1 การออกแบบไพรเมอร์

4.1.1 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนกลางของยีน *NCED3* ในยางพารา

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NCED3* ในพืชอื่นมาทำการวิเคราะห์ multiple alignment ด้วยโปรแกรม analyze gene เพื่อใช้ในการออกแบบ degenerate primer โดยค้นหาข้อมูลในฐานข้อมูล GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ซึ่งพืชที่ได้นำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนกลางของยีน *NCED3* ในยางพาราเป็นพืชที่อยู่ในอันดับ Malpighiales ได้แก่ ละหุ่ง สับดำ และมันสำปะหลัง ซึ่งอยู่ในอันดับเดียวกันกับยางพารา

4.1.2 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (full length) ของยีน *NCED3* ในยางพารา

ออกแบบ specific primers จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนกลางของยีน *NCED3* สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NCED3* ในส่วนของปลาย 5' (ตารางที่ 2) ซึ่งมีขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 1,785 bp

ตารางที่ 2 ชนิดของไพรเมอร์สำหรับการโคลนยีน *NCED3*

Name	Primer (5'-3')	Temperature (°C)	Expected size (bp)
AF2	ATG TCT GAA GAT GAY TTG CC	57	461
AR1	TTC CAR AGA TGG AAA CAG AA	55	
FNCED3	CTC TCC AMA CTC CTT CCA TTC	53.9	1,785
RNCED3	CTA RGC YTG CTT CTS CAA ATC	53.8	

#### 4.2 การสกัดอาร์เอ็นเอ

ทำการสกัดอาร์เอ็นเอ (ดัดแปลงจาก Venkatachalam *et al.*, 1999) จากชิ้นส่วนใบของต้นกล้าอายุ 7 วัน บดด้วยไนโตรเจนเหลว เติมสารละลายบัฟเฟอร์ (0.1 M LiCl, 0.1 M Tris HCl pH 8.0, 0.01 M EDTA, 2% SDS) และสารละลายฟีนอล 800 ไมโครลิตร สารละลายคลอโรฟอร์ม ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติมสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วดังกล่าว จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนใสหลอดใหม่เติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 1 เท่าของส่วนใส และเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตทปริมาตร 1/10 เท่าของส่วนใส เก็บสารละลายอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 70% เอทานอล 2 ครั้ง ตากตะกอนอาร์เอ็นเอ เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนด้วยน้ำ DEPC ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใส และเติมสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติมสารละลาย 8 โมลาร์ ลิเทียมคลอไรด์ปริมาตร 1/3 เท่าของส่วนใส และนำไปตกตะกอนอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติม 2 โมลาร์

ลิเทียมคลอไรด์ปริมาตร 1/3 เท่าของปริมาตรรวม นำไปหมუნเหียงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ล้างตะกอนด้วยการเติม 100% เอทานอล 1 เท่าของปริมาตรรวม นำไปหมუნเหียงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตากตะกอนอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ละลายตะกอนด้วยน้ำ DEPC ปริมาตร 20 - 50 ไมโครลิตร เก็บอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง nanodrop ที่ความยาวคลื่น 230, 260 และ 280 นาโนเมตร จดบันทึกค่าความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอในหน่วย นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/ $\mu$ l) และนำอาร์เอ็นเอที่ได้จากการสกัดมาตรวจสอบด้วยวิธีการอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

#### 4.3 การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) จากอาร์เอ็นเอ

ทำการสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากส่วนใบของต้นกล้วยพาราตามวิธีการของ Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA) โดยการเตรียมปฏิกิริยาในปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย อาร์เอ็นเอจากส่วนใบของกล้วยพาราความเข้มข้น 1 pg - 5  $\mu$ g, Oligo (dT)18 primer 1 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP Mix 1 ไมโครลิตร และเติมน้ำ DEPC จนมีปริมาตรครบ 15 ไมโครลิตร นำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และวางบนน้ำแข็งทันที หลังจากนั้นเติม 5X RT Buffer 4 ไมโครลิตร และ Maxima H Minus Enzyme Mix 1 ไมโครลิตร นำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เก็บ cDNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทำการวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของ cDNA ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230, 260 และ 280 นาโนเมตร จดบันทึกค่าความเข้มข้นของ cDNA ในหน่วย นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/ $\mu$ l)

#### 4.4 การโคลนยีน *NCED3* โดยการใช้ degenerate primers

ทำการสังเคราะห์ยีน *NCED3* จาก cDNA ของกล้วยพาราด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ ร่วมกับไพรเมอร์ชนิดดีเจเนอเรต (degenerate primer) โดยการนำไพรเมอร์ที่ได้มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสม ได้แก่อุณหภูมิที่ 60, 59.3, 58, 56.2, 54, 52.1, 50.8 และ 50 องศาเซลเซียส โดยการนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ กับ cDNA ของกล้วยพารา โดยทำการเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 5X Phusion HF Buffer 5 ไมโครลิตร

10 mM dNTP mixture 0.5 ไมโครลิตร, 10 mM MgCl<sub>2</sub> Solution 0.25 ไมโครลิตร, 10 μM FNCED3 (forward primer) 1.25 ไมโครลิตร, RNCED3 (reverse primer) 1.25 ไมโครลิตร, Phusion Hot startII DNA Polymerase 0.25 ไมโครลิตร, cDNA ของยางพาราความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร และน้ำ DEPC (DEPC-treated water) 15.5 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นดูดลงในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร นำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องพีซีอาร์ โดยตั้งอุณหภูมิ และกำหนดจำนวนรอบดังนี้

- 1) Pre-denaturation อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
- 2) Denaturation อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที
- 3) Annealing อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที
- 4) Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที  
ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ
- 5) Post-extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
- 6) Hold อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ทำการตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยการนำดีเอ็นเอ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับ 10X loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และหยอดลงในช่องของแผ่นเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5% ในสารละลาย 0.5X บัฟเฟอร์ TBE ด้วยแรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที ย้อมเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 15 นาที ตรวจสอบแถบ และขนาดของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง gel documentation เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, USA) หลังจากนั้นทำปฏิกิริยาถูกใส่พีซีอาร์ปกติโดยใช้ อุณหภูมิในปฏิกิริยาของ annealing ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอชัดเจน โดยทำการเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ อีกครั้ง (re-amplification )

#### 4.5 การสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล และการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์

ตัดเจลบริเวณแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ตามวิธีการของ E.Z.N.A<sup>®</sup> Gel Extraction Kit (Omega Bio-tek, USA) โดยทำการชั่งน้ำหนักเจลที่ตัดมาได้ เติม 1 volume binding buffer (XP2) หลอมละลายเจลที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที เขย่าหลอดทุกๆ 2 - 3 นาที ดูดใส่หลอด HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column และเติมสารละลายที่มีดีเอ็นเอ

ปริมาตรไม่เกิน 700 ไมโครลิตร ใน HiBind® DNA Mini Column นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายทิ้ง เติมสารละลายที่มีดีเอ็นเอปริมาตรไม่เกิน 700 ไมโครลิตรใน HiBind® DNA Mini Column จนหมด จากนั้นเติม binding buffer (XP2) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายทิ้ง เติม SPW Wash Buffer 700 ไมโครลิตร (ทำการเจือจาง SPW Wash Buffer ด้วย 100% ethanol ก่อนใช้) นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายทิ้ง เติม SPW Wash Buffer 700 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายทิ้ง ทำการหมุนเหวี่ยงหลอด HiBind® DNA Mini Column ที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ column แห้ง ย้าย HiBind® DNA Mini Column ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที เพื่อระเหยเอทานอลออกจาก column ทำการชะดีเอ็นเอโดยการเติมน้ำ DEPC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (elute 1) และปริมาตร 10 ไมโครลิตร (elute 2) ลงบริเวณกึ่งกลางของ HiBind® DNA Mini Column ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (ดังหัวข้อที่ 4.4)

#### 4.6 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอชิ้นส่วนยีน *NCED3* กับพลาสมิด RBC TA cloning vector

นำดีเอ็นเอของส่วนยีน *NCED3* เชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด RBC TA cloning vector ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase (RBC Bioscience, Taiwan) โดยการเตรียมปฏิกิริยาปริมาตร 10 ไมโครลิตร ในหลอด PCR ขนาด 200 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย ligation buffer A 1 ไมโครลิตร, ligation buffer B 1 ไมโครลิตร, RBC TA cloning vector 1 ไมโครลิตร, ดีเอ็นเอของส่วนยีน *NCED3* 6 ไมโครลิตร และ T4 DNA ligase 1 ไมโครลิตร ผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยการดูดขึ้นลงเบาๆ โดยการใช้ปิเปต และบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 4.7 การถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่แบคทีเรีย

ทำการถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ด้วยวิธีการ heat shock โดยดัดแปลงวิธีการตาม RBC HIT competent cell (RBC Bioscience, Taiwan) ภายในตู้ย่ำเยี๋ยง เริ่มจากการนำ competent cell แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  มาวางไว้บนน้ำแข็ง และรอจน competent cell ละลาย 1/3 ของปริมาตร competent cell เติมดีเอ็นเอสายผสม pTA-NCED3 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ดัดหลอดเบาๆ เพื่อให้ competent cell และ ดีเอ็นเอสายผสม pTA-NCED3 เข้ากัน วางไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที เมื่อครบเวลาให้รีบนำมาวางบนน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 30 นาที เติมหอาหารเหลว LB (Luria-Bertani broth) ไม่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (อุณหภูมิตั้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสก่อนนำมาใช้) ปริมาตร 790 ไมโครลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ใช้ปิเปตดูดอาหารเหลว LB ออก 800 ไมโครลิตร และดูดเป่าตะกอน competent cell ด้วยปิเปตเบาๆ จนอาหารเหลว LB และตะกอน competent cell นั้นเข้ากัน นำสารแขวนลอยเซลล์ที่ได้เกลี่ยบนอาหารแข็ง LB (Luria-Bertani agar) ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (อุณหภูมิตั้งที่อุณหภูมิตั้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสก่อนนำมาใช้) บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว สีขาวขุ่น

#### 4.8 การตรวจสอบพลาสมิดที่มีฮีนเป้าหมาย

นำโคโลนีเดี่ยว สีขาวขุ่นของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ที่มีดีเอ็นเอสายผสมของ pTA-NCED3 เลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการตรวจสอบชิ้นส่วนของฮีน NCED3 ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยเตรียมปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X Tag Buffer 2.5 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP mixture 1 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 2 ไมโครลิตร, 10  $\mu$ M FNCED3 (forward primer) 1 ไมโครลิตร, 10  $\mu$ M RNCED3 (reverse primer) 1 ไมโครลิตร Taq DNA Polymerase 0.5 ไมโครลิตร, cDNA ของยาลำพาราความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 4 ไมโครลิตร และน้ำ DEPC 13 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดให้



เข้ากันในหลอด PCR ขนาด 200 ไมโครลิตร นำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องพีซีอาร์ Thermo cycler โดยตั้งอุณหภูมิ และกำหนดจำนวนรอบดังนี้

- 1) Pre-denaturation อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
  - 2) Denaturation อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที
  - 3) Annealing อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที
  - 4) Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที
- ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ
- 5) Post-extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
  - 6) Hold อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ทำการเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, USA) เลือกโคโลนีที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 1,785 คู่เบส จาก master plate เพื่อนำไปใช้ในการสกัดพลาสมิดต่อไป

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

ทำการเขย่าเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  จากโคโลนีสีขาวขุ่นที่ปรากฏ แถบดีเอ็นเอของยีน *NCED3* ดังหัวข้อที่ 4.8 เลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 - 16 ชั่วโมง ทำการแยกสกัดดีเอ็นเอสายผสม pTA-*NCED3* ตามวิธีการของ E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid DNA Mini Kit I (Omega Bio-tek, USA) ปริมาตร 1 - 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายทิ้ง เติมน้ำ RNase (เติมน้ำ RNase A ก่อนนำมาใช้ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ละลายตะกอนเซลล์ เติมน้ำ solution II ปริมาตร 250 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาหลายๆ ครั้ง ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 - 3 นาที จากนั้นเติมน้ำ solution III ปริมาตร 350 ไมโครลิตร และกลับหลอดไปมาประมาณ 2 - 3 นาที จนเห็นตะกอนสีขาวขุ่น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสปริมาตร 700 ไมโครลิตร ใส่ลงใน HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายทิ้ง เติมน้ำ HBC buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

30 วินาที เทสารละลายทิ้ง เติม DNA wash buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร 2 ครั้ง (DNA wash buffer ต้องเติม 100% ethanol ก่อนนำมาใช้) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที เทสารละลายทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เปิดฝา HiBind® DNA Mini Column ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที เพื่อให้เอทานอลระเหยออกจาก column จากนั้นย้าย column ใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติมน้ำ DEPC (DEPC-treated water) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (elute 1) และปริมาตร 20 ไมโครลิตร (elute 2) ลงบริเวณกลาง filter ของ HiBind® DNA Mini Column ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที เพื่อชะดีเอ็นเอสายผสมลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บดีเอ็นเอสายผสมที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการวัดปริมาณ และความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอสายผสม pTA-NCED3 ด้วยเครื่อง nanodrop ที่ความยาวคลื่น 230, 260 และ 280 นาโนเมตร จดบันทึกค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอสายผสม pTA-NCED3 ในหน่วย นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/μl) และนำดีเอ็นเอสายผสม pTA-NCED3 ที่ได้จากการสกัดแยก มาตรวจทดสอบด้วยเทคนิคอะไมครอเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสคัดเลือกโคลนที่ถูกต้องนำส่งวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ universal primer คือ T7 promoter เป็น forward primer และ M13 เป็น reverse primer นำผลที่ได้มาตรวจทดสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NCED3 กับฐานข้อมูล GenBank ของเว็บไซต์ NCBI โดยใช้โปรแกรม nucleotide blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เพื่อหาค่า เปอร์เซ็นต์ความเหมือนของยีน NCED3 กับพืชอื่นๆ ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล

## 5. การศึกษาการแสดงออกของยีน NCED3 ของต้นกล้วยพารา 3 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำ โดยใช้เทคนิค quantitative real time PCR (qRT-PCR)

### 5.1 การออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน NCED3

การออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน NCED3 โดยการออกแบบ forward primer และ reverse primer สำหรับการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR จากข้อมูลลำดับเบส cDNA ของยีน NCED3 โดยอาศัยลำดับเบสของ cDNA ที่ได้จากการโคลนยีนดังกล่าว เพื่อนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีนเหล่านี้โดยใช้ซอฟต์แวร์จาก [www.genscript.com](http://www.genscript.com) โดยไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับศึกษาการแสดงออกของยีนมีดังต่อไปนี้

ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน *NCED3* ได้แก่

NCED\_L2F = 5' GAGCAAACCCGCTTCACGAG 3'

NCED\_R2R = 5' GAAGCGGCAAGCGTAACTCAC 3'

ไพรเมอร์สำหรับใช้เป็นยีนอ้างอิง 18s rRNA ได้แก่

18s rRNA\_F = 5' AAGCCTACGCTCTGGATACATT 3'

18s rRNA\_R = 5' CCCGACTGTCCCTGTTAATC 3'

## 5.2 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *NCED3*

นำ cDNA ของใบยางพารา 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ RRIT 408, RRIM 623 และ PB 5/51 เตรียมความเข้มข้นให้เป็น 50 ng/ $\mu$ l เพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *NCED3* ในต้นกล้ายางพาราที่งอกขึ้นในระยะเวลาต่าง ๆ โดยการใช้เทคนิค (qRT-PCR) เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *NCED3* กับ ยีนอ้างอิง actin หรือ 18s rRNA จากยางพารา ทำ real-time PCR ด้วย Eva<sup>®</sup> Green Super Mix (Bio-Rad, USA) โดยใช้ cDNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ 50 ng/ $\mu$ l total reaction 10  $\mu$ l เป็นแม่แบบ และใช้ forward primer และ reverse primer ที่ได้จากการออกแบบในการสังเคราะห์ยีน *NCED3* โดยมีขั้นตอนการสังเคราะห์ดังนี้ การแยกสายดีเอ็นเอออกจากกันใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 นาที ทำปฏิกิริยา PCR จำนวน 35 รอบ ได้แก่ denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที นำ ค่า Ct ที่ได้จากการอ่านค่าของเครื่อง real-time PCR มาวิเคราะห์ผลด้วยวิธี delta/delta C<sub>T</sub> ( $\Delta\Delta C_T$  method) ตามวิธีการของ Livak และ Schmittgen, (2001) เพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน โดยใช้ยีน 18s rRNA เป็นยีนอ้างอิง

## 6. การวิเคราะห์ปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกทั้งหมดของต้นกล้ายางพารา 3 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำ

### 6.1 การสกัดกรดแอบไซซิกจากใบยางพาราภายใต้สภาวะขาดน้ำ

ทำการเก็บตัวอย่างใบของยางพารา 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ RRIT 408, RRIM 623 และ PB 5/51 ที่ทำการงดน้ำเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตามลำดับ ชั่งน้ำหนักสด (fresh weight) ของตัวอย่างใบและบันทึกผล จากนั้นนำไประเหยน้ำออกโดยใช้เครื่อง freeze dry (lyophilize) เป็นเวลา 4 วัน ชั่งน้ำหนักแห้ง (dry weight) ของแต่ละตัวอย่างเท่ากับ 100 มิลลิกรัม ใส่ในหลอด polypropylene test tubes ขนาด 50 มิลลิลิตร (Splifesciences, Korea) เติม 100% methanol extracting ในอัตราส่วน 10 มิลลิกรัม ของน้ำหนักแห้งต่อ 1 มิลลิลิตร ของ 100% methanol extracting แซ่หลอด ในน้ำแข็ง จากนั้นทำการบดตัวอย่างด้วยเครื่อง homogenizer (IKA scientifica, Germany) เป็นเวลา 1 นาที โดยหยุดทุกๆ 30 วินาที หลังจากนั้นทำการเขย่าตัวอย่างในน้ำแข็งโดยใช้เครื่อง sonicator (Comcube, Thailand) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำตัวอย่างไป centrifuge ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสใส่ในหลอด polypropylene test tubes ขนาด 50 มิลลิลิตร (Splifesciences, Korea) เก็บในที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 6.2 การทำให้สารสกัดของกรดแอบไซซิกบริสุทธิ์

นำสารสกัดกรดแอบไซซิกทั้งหมดที่ได้ ทำให้บริสุทธิ์ โดยการใช้ Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridges (Millipore) (ดัดแปลงวิธีการจาก Walker-Simmons *et al.*, 2000) ทำการเจือจางสารละลาย ให้เท่ากับ 70% methanol ในอัตราส่วน 200 ต่อ 800 ไมโครลิตร ของสารสกัดกรดแอบไซซิก ต่อ 62.5% methanol extracting ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml (Sorenson BioScience, USA) จำนวน 2 หลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการ vortex เป็นเวลา 2 นาที เก็บที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการล้าง Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridges (Millipore) ด้วย 100% methanol extracting ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปล่อยสารละลายทิ้ง เติม 70% methanol extracting ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปล่อยสารละลายทิ้งโดยใช้ disposable syringes ขนาด 3 มิลลิลิตร ปล่อยสารละลาย ลงอย่างช้าๆ เติม 70% methanol extracting ที่ทำการเจือจางไว้ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใช้ disposable syringes ขนาด 3 มิลลิลิตร ปล่อยสารละลายผ่าน Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridges (Millipore) อย่างประณีต ใส่ในหลอด polypropylene test tubes ขนาด 15 มิลลิลิตร (Splifesciences, Korea) เติม 70% methanol

ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใน Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridges (Millipore) ปล่อยสารละลายในหลอด polypropylene test tubes ขนาด 15 มิลลิลิตร (Spllifesciences, Korea) ปิดฝาหลอดให้สนิท เก็บสารละลายในที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเติม 100% methanol ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน โดยการ vortex เป็นเวลา 2 นาที แขนหลอดตัวอย่างในน้ำแข็ง นำสารละลายตัวอย่างไประเหย methanol ด้วยเครื่อง speed-vac concentrator เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำสารละลายไประเหยน้ำออก ด้วยเครื่อง freeze dry (lyophilize) เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เพื่อให้สารละลายแห้งสนิทมากขึ้น เก็บตัวอย่างในที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 6.3 การวิเคราะห์ปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกทั้งหมด

ทำการละลายตัวอย่าง ในหลอด polypropylene test tubes ขนาด 15 มิลลิลิตร (Spllifesciences, Korea) โดยการเติม 100% methanol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร vortex สารละลายให้เข้ากัน เป็นเวลา 2 นาที เติม TBS buffer ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการ vortex เป็นเวลา 2 นาที แขนสารละลายในน้ำแข็ง เจือจางสารละลายโดยการเติม TBS buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการ vortex เป็นเวลา 2 นาที แขนสารละลายในน้ำแข็ง เจือจาง ABA-tracer ด้วยการเติม TBS buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ต่อ ABA-tracer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร ในหลอด polypropylene test tubes ขนาด 15 มิลลิลิตร (Spllifesciences, Korea) vortex สารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที แขนสารละลายในน้ำแข็ง ทำการเตรียม ABA Standard โดยใช้ Hormone standard strips จาก Phytodetek<sup>®</sup> ABA Test Kit โดยการตัด Hormone standard strips ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml (Sorenson BioScience, USA) เติม TBS buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร vortex สารละลายทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการเจือจางสารละลายโดยการเติม TBS buffer ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร และเติมสารละลายจากหลอด A1 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร (หลอด B1) ดูดสารละลายจากหลอด B1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติม TBS buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (หลอด C1) ดูดสารละลายจากหลอด C1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติม TBS buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (หลอด D1) ดูดสารละลายจากหลอด D1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติม TBS buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (หลอด E1) ดูดสารละลายจากหลอด E1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติม TBS buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (หลอด F1) ดูดสารละลายจากหลอด F1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติม TBS buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (หลอด G1) นำสารละลายแต่ละหลอดไป vortex เป็นเวลา 2 นาที เก็บสารละลายในที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเตรียม Anti-ABA coated testwells จาก

Phydotetek<sup>®</sup> ABA Test Kit ตามจำนวนตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิก จากนั้นเติม ABA Standard หรือ สารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน Anti-ABA coated testwells จากนั้นเติม ABA-tracer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมสารละลายอย่างประณีต ปิด Anti-ABA coated testwells ด้วยแผ่น plate sealer ใส่ในกล่อง humid box จากนั้นบ่ม testwells ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเตรียม Substrate solution โดยการละลาย PNP substrate 1 เม็ด ต่อ Substrate diluent ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หลังจากครบ 3 ชั่วโมง ทิ้งสารละลายลงในอ่างน้ำอย่างรวดเร็ว และระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ ล้าง testwells ด้วย PBST wash buffer 3 ครั้ง เคาะ testwells บนกระดาษทิชชู เติม Substrate solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปิด testwells ด้วยแผ่น plate sealer ใส่ในกล่อง humid box แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (PowerWaveX, Biotek) นำค่าที่อ่านได้มาคำนวณหาปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกทั้งหมด

## 7. การทดสอบการตอบสนองของปากใบยางพาราต่อกรดแอบไซซิก

ทำการทดสอบการตอบสนองของปากใบยางพารา 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ RRIT 408, RRIM 623 และ PB 5/51 ในสภาวะปกติ จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ตำแหน่ง โดยทำการเตรียมสารละลาย บัฟเฟอร์ ซึ่งทำหน้าที่ในการกระตุ้นให้ปากใบเปิดอย่างเต็มที่ (10mM KCl, 7.5mM iminodiacetic acid และ 10 mM MES hydrate, ปรับ pH 6.2 ด้วย KOH) นำใบยางพารา (intact leaves) ที่แผ่ขยายอย่าง สมบูรณ์ ของทั้ง 3 พันธุ์ดังกล่าว แช่ในละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากครบ 2 ชั่วโมง แช่ใบยางพาราในสารละลาย ABA ที่มีความเข้มข้น 0, 10, 20, 50 และ 100  $\mu$ M เป็นเวลา 30 นาที ทำการลอกผิวใบ ตัดชิ้นส่วนของผิวใบด้วยใบมีดโกน วางชิ้นส่วนดังกล่าว บนแผ่นสไลด์ หยดน้ำกลั่น 1-2 หยด ปิดแผ่นสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์ ตรวจสอบความกว้างของ ปากใบ (stomatal aperture) ในต้นกล้ายางพาราทั้ง 3 พันธุ์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ Leica DM750 กำลังขยาย 100 เท่า (ดัดแปลงวิธีการจาก Liu *et al.*, 2016)

## 8. วิเคราะห์ผลข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) วิเคราะห์ค่าเฉลี่ย และความแปรปรวนของข้อมูลด้วยโปรแกรม R version 2.14.0 และเปรียบเทียบ ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

### บทที่ 3

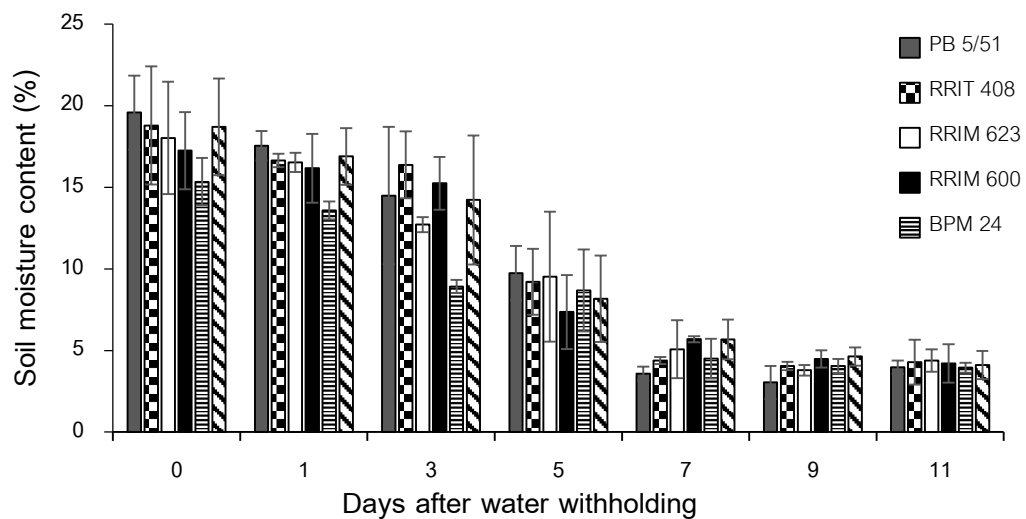
#### ผล

#### 1. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นกล้ายางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำ

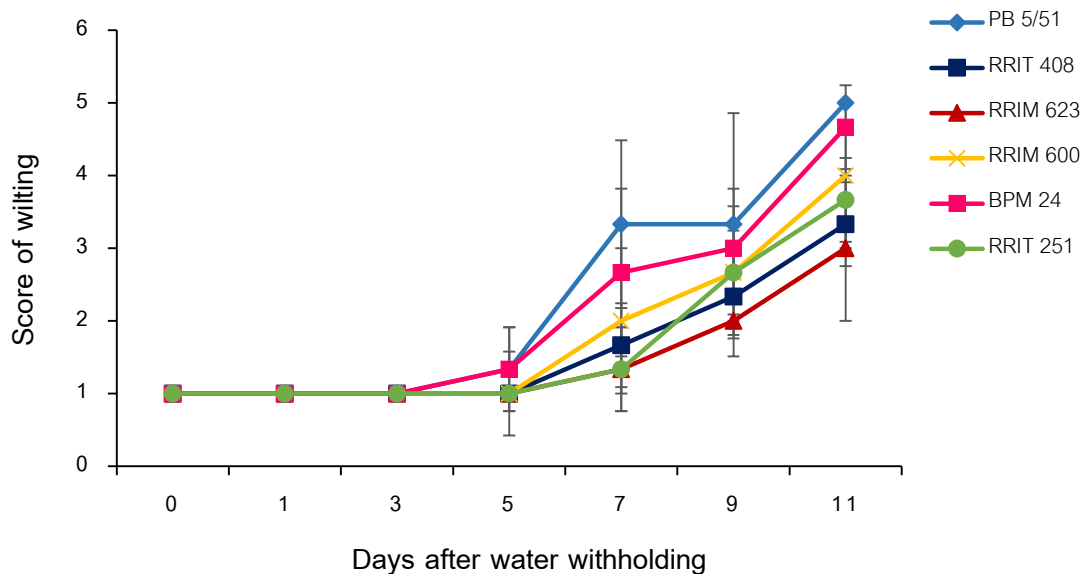
จากการเก็บข้อมูลปริมาณความชื้นดินภายในภาชนะปลูกของต้นกล้ายางพาราแต่ละพันธุ์ พบว่า ในทุกช่วงของการงดน้ำ ปริมาณความชื้นดินมีค่าใกล้เคียงกัน โดยปริมาณความชื้นดินภายในภาชนะปลูกก่อนทำการงดน้ำ มีค่าเท่ากับ 15.33 - 19.58% แต่หลังจากทำการงดน้ำเป็นเวลา 1 - 5 วัน ปริมาณความชื้นดินลดลงประมาณ 3 - 4% ของแต่ละวัน และเมื่อทำการงดน้ำเป็นเวลา 7 - 11 วัน พบว่า ปริมาณความชื้นดินมีค่าลดลงเพียงเล็กน้อยและค่อนข้างคงที่ เมื่อทำการงดน้ำเป็นเวลา 11 วัน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.9 - 4.4% ดังภาพที่ 4

จากการบันทึกภาพถ่ายลักษณะสัณฐานวิทยาของยางพารา 6 พันธุ์ ที่ทำการงดน้ำในระยะเวลาต่างๆ พบว่า ในช่วง 3 วันแรก หลังจากทำการงดน้ำ ยางพาราทั้ง 6 พันธุ์ยังคงอยู่ในสภาพปกติ ไม่พบอาการขาดน้ำหรือการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา แต่หลังจากงดน้ำเป็นเวลา 5 วัน พบว่า ปริมาณความชื้นในดินลดลง ส่งผลให้ต้นกล้ายางพารามีอาการขาดน้ำ จนกระทั่งในวันที่ 11 หลังจากงดน้ำ ต้นกล้ายางพาราแสดงอาการขาดน้ำอย่างรุนแรง โดยลักษณะอาการที่พบคือ อาการเหี่ยวของใบ ก้านใบ และปลายยอด ตามลำดับ ลักษณะการเหี่ยวดังกล่าวเกิดขึ้นก่อนกับยางพาราพันธุ์ PB 5/51, BPM 24, RRIM 600, RRIT 251, RRIT 408, และ RRIM 623 ตามลำดับ (ภาพที่ 5) โดยต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIT 408 และ RRIT 251 แสดงอาการเหี่ยวของแผ่นใบหลังการงดน้ำเป็นเวลา 7 วัน และมุ่มใบ เริ่มเปลี่ยนหลังงดน้ำเป็นเวลา 9 วัน ในขณะที่ต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIM 600, BPM 24 และ PB 5/51 แสดงอาการเหี่ยวของแผ่นใบหลังการงดน้ำเป็นเวลา 5 วัน และมุ่มใบเริ่มเปลี่ยนหลังงดน้ำเป็นเวลา 7 วัน ต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIM 623 แสดงอาการเหี่ยวของแผ่นใบหลังการงดน้ำเป็นเวลา 9 วัน และมุ่มใบเริ่มเปลี่ยนเล็กน้อยหลังงดน้ำเป็นเวลา 11 วัน ซึ่งช้ากว่าพันธุ์อื่นๆ (ภาพที่ 6) หลังจากทำการให้น้ำแก่ต้นกล้ายางพาราทุกพันธุ์อีกครั้ง (re-watering) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า ต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIM 623 มีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 100% รองลงมาคือ ต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIT 408 และ RRIT 251 ซึ่งมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 78% ในขณะที่เดียวกันต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIM 600 และ BPM 24 มีความสามารถในการฟื้นฟูสภาพการเจริญเติบโตให้มีอัตราการรอดชีวิตได้เพียง 67 % ส่วนต้นกล้ายางพาราพันธุ์

PB 5/51 มีอัตราการรอดชีวิตเพียง 55% ซึ่งน้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์อื่นๆ (ภาพที่ 7) นอกจากนี้การตรวจสอบการตอบสนองของลักษณะสัญญาณวิทยามีความสัมพันธ์กับปริมาณความชื้นในดิน เนื่องจากปริมาณความชื้นในดินที่ลดลงทำให้ต้นกล้าอย่างพาราเกิดอาการขาดน้ำ สังเกตเห็นได้จากลักษณะอาการเหี่ยวของต้นกล้าอย่างพารา ดังนั้นการตอบสนองของลักษณะสัญญาณวิทยาสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดในการแบ่งกลุ่มพันธุ์อย่างพาราที่ทนทานต่อสภาวะแล้ง และพันธุ์อย่างพาราที่ไวต่อสภาวะแล้ง เพื่อใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *NCED3* และปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิก

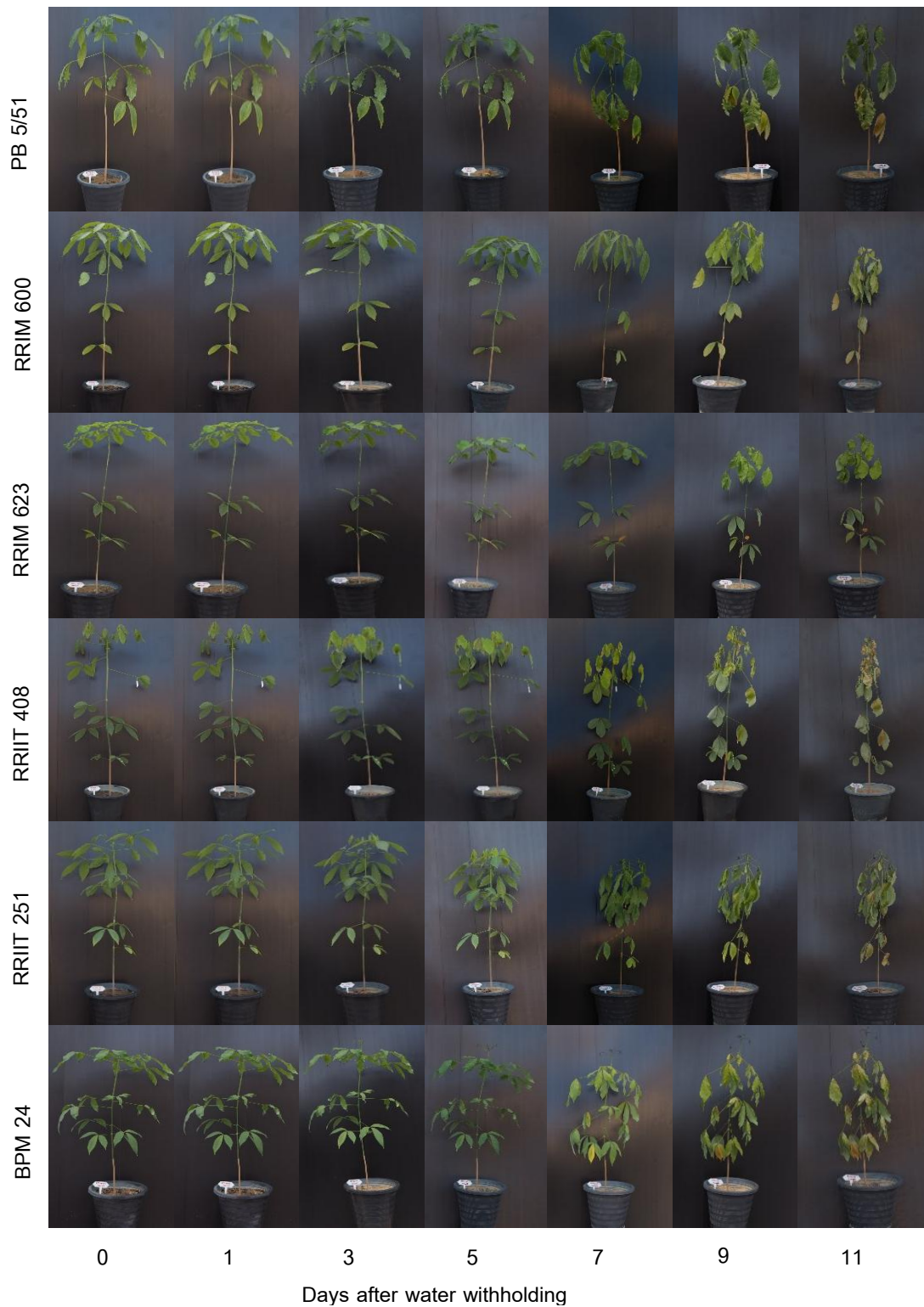


ภาพที่ 4 การศึกษาปริมาณความชื้นดินภายในภาชนะปลูกของต้นกล้าอย่างพารา 6 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำ เป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตามลำดับ

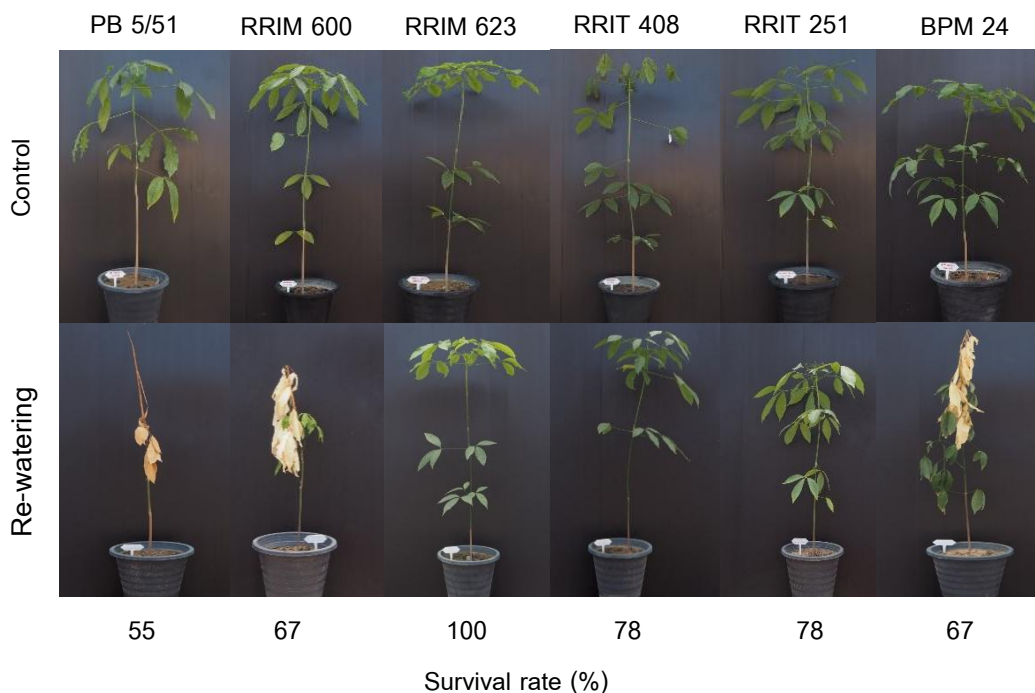


ภาพที่ 5 ระดับการประเมินลักษณะสัญญาณวิทยาของต้นกล้าอย่างพารา 6 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำ เป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตามลำดับ





ภาพที่ 6 ลักษณะสัณฐานวิทยา ของต้นกล้ายางพาราพันธุ์ PB 5/51, RRIM 600, RRIM 623, RRIIT 408, RRIIT 251 และ BPM 24 ภายใต้สภาวะขาดน้ำ เป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตามลำดับ

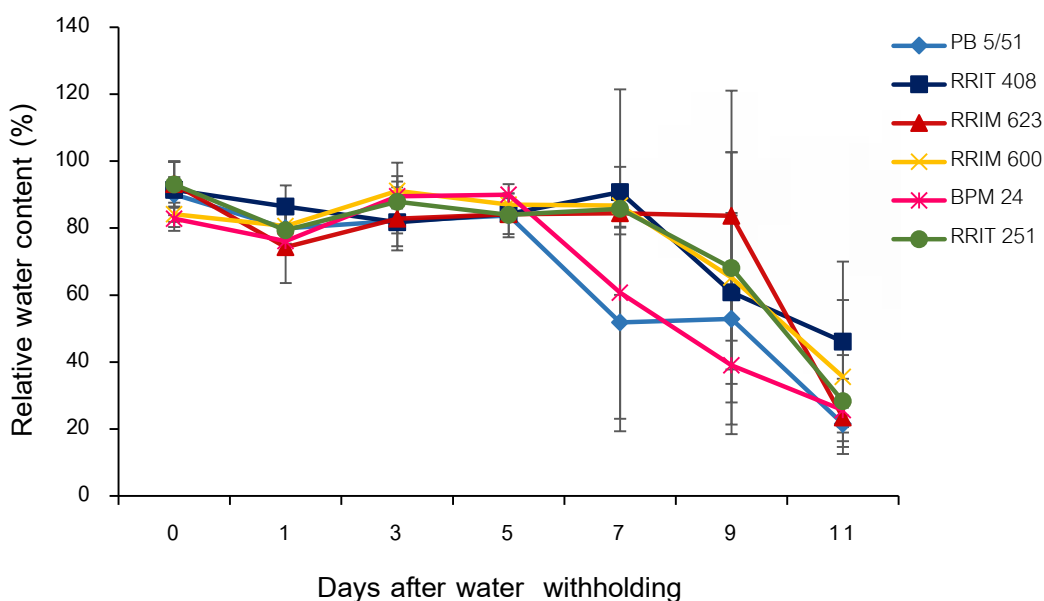


ภาพที่ 7 ลักษณะสัณฐานวิทยา ของต้นกล้ายางพาราพันธุ์ PB 5/51, RRIM 600, RRIM 623, RRIT 408, RRIT 251 และ BPM 24 หลังจากงดน้ำเป็นเวลา 11 วัน และทำการให้น้ำ (re-watering) เป็นเวลา 2 สัปดาห์

## 2. การศึกษาการตอบสนองทางสรีรวิทยาของต้นกล้ายางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำ

### 2.1. การศึกษาปริมาณน้ำสัมพัทธ์ (relative water content; RWC)

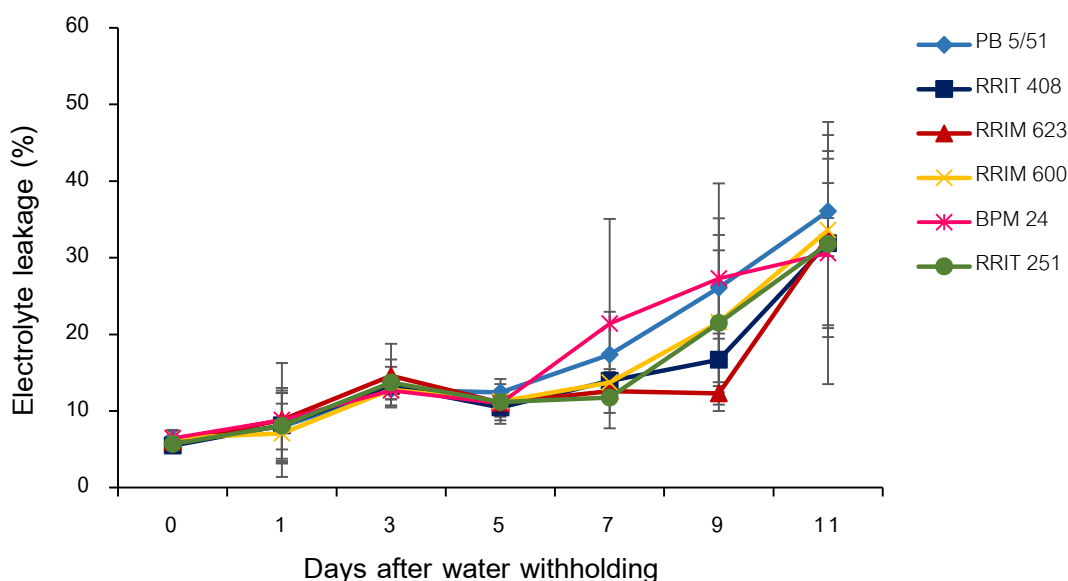
จากการศึกษาปริมาณน้ำสัมพัทธ์ของต้นกล้ายางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำ พบว่า ในการงดน้ำเป็นเวลา 0 - 5 วันแรก ต้นกล้ายางพาราทุกพันธุ์มีปริมาณน้ำสัมพัทธ์ที่ไม่แตกต่างกันโดยมีค่าอยู่ระหว่าง 74.27 - 93.08 % แต่เมื่อทำการงดน้ำเป็นเวลา 7, 9 และ 11 วัน ตามลำดับ ปริมาณน้ำสัมพัทธ์มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องและมีค่าต่ำสุดถึง 21.52% ในต้นกล้ายางพาราพันธุ์ PB 5/51 นอกจากนี้ หลังจากทำการงดน้ำเป็นเวลา 7 วัน พบว่า ต้นกล้ายางพาราพันธุ์ PB 5/51 และ BPM 24 มีปริมาณน้ำสัมพัทธ์ต่ำกว่าพันธุ์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ และมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง (ภาพที่ 8) แสดงให้เห็นว่าต้นกล้ายางพาราพันธุ์ PB 5/51 และ BPM 24 มีความสามารถในการรักษาระดับน้ำในใบได้น้อยกว่าพันธุ์อื่น ซึ่งอาจจัดว่าเป็นพันธุ์ที่ไวต่อสภาวะแล้ง ส่วนต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIT 408, RRIM 623, RRIT 251 และ RRIM 600 พบว่า หลังจากงดน้ำเป็นเวลา 7 วัน ต้นกล้ายางพาราทั้ง 4 พันธุ์ ยังคงมีความสามารถรักษาระดับน้ำในใบได้สูง และเริ่มลดลงในวันที่ 9 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการตอบสนองของลักษณะสัณฐานวิทยา



ภาพที่ 8 ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ของต้นกล้ายางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำ เป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตามลำดับ

## 2.2 การศึกษาปริมาณการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ (electrolyte Leakage; EL)

จากการศึกษาปริมาณการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ของต้นกล้ายางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำ โดยทำการเก็บตัวอย่างใบหลังจากงดน้ำเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตามลำดับ พบว่า ในการงดน้ำเป็นเวลา 1 - 5 วัน ต้นกล้ายางพาราทุกพันธุ์มีการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ของใบที่ไม่แตกต่างกันโดยมีค่าอยู่ระหว่าง 7.06 - 14.61 % ปริมาณการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ในใบยางพาราเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 1 ของการงดน้ำ โดยเฉพาะต้นกล้ายางพาราพันธุ์ BPM 24 และ PB 5/51 ที่มีปริมาณการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ในใบสูงกว่าพันธุ์อื่นๆ อย่างเห็นได้ชัดเจน ในวันที่ 7 ของการงดน้ำ และมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งต่างจากพันธุ์ RRIM 623 และ RRIT 251 อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่าในวันที่ 9 ของการงดน้ำ ปริมาณการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ในใบยางพาราพันธุ์ RRIM 623 มีค่าต่ำที่สุด ซึ่งเท่ากับ 12.29 % รองลงมาคือ ยางพาราพันธุ์ RRIT 408, RRIT 251, RRIM 600, PB 5/51 และ BPM 24 มีค่าเท่ากับ 16.69, 21.48, 21.56, 26.08 และ 27.28 % ตามลำดับ (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 ปริมาณการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ในใบ ของต้นกล้ายางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำ เป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตามลำดับ

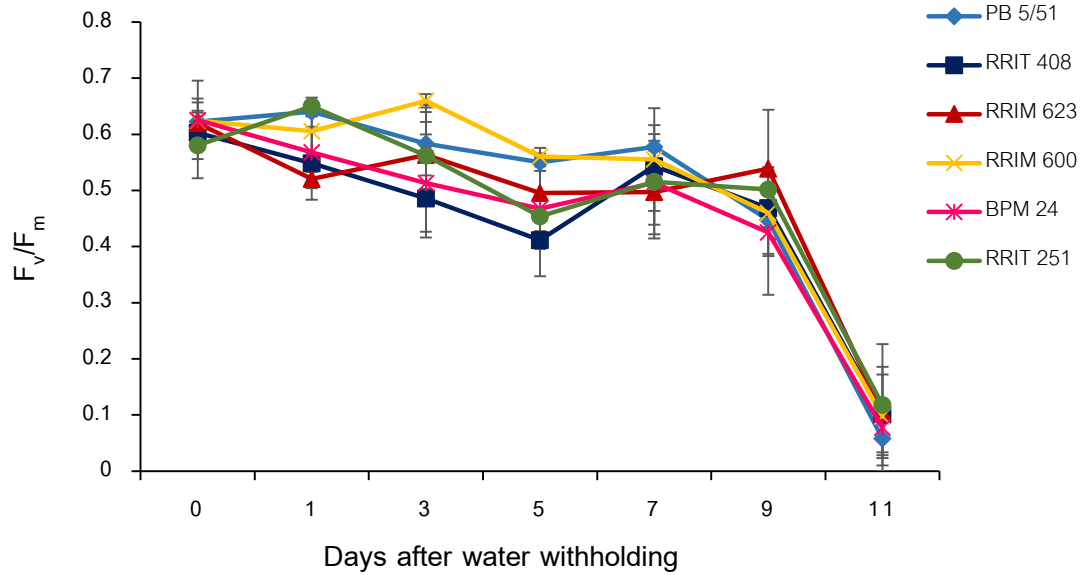
### 2.3 ประสิทธิภาพการใช้แสง (maximum quantum efficiency of photosystem II, $F_v/F_m$ )

ค่าประสิทธิภาพการใช้แสงในวันที่ 0 ก่อนการงดน้ำ ต้นกล้ายางพาราทั้ง 6 พันธุ์ มีค่าประสิทธิภาพการใช้แสงที่ใกล้เคียงกันอยู่ที่ 0.58 - 0.63 และเมื่อทำการงดน้ำอย่างต่อเนื่อง เห็นได้ว่าค่าประสิทธิภาพการใช้แสงมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ ในต้นกล้ายางพาราทุกพันธุ์ และจะลดลงมากที่สุดหลังจากงดน้ำ เป็นเวลา 11 วัน ค่าประสิทธิภาพการใช้แสงจะลดลงมีค่าอยู่ที่ 0.08 - 0.23 (ภาพที่ 10) แสดงให้เห็นว่าเมื่อต้นกล้ายางพาราอยู่ในสภาวะขาดน้ำเป็นเวลานานส่งผลให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงของยางพาราลดลง ทั้งนี้ ไม่พบความแตกต่างที่ชัดเจนระหว่างพันธุ์ยางพารา

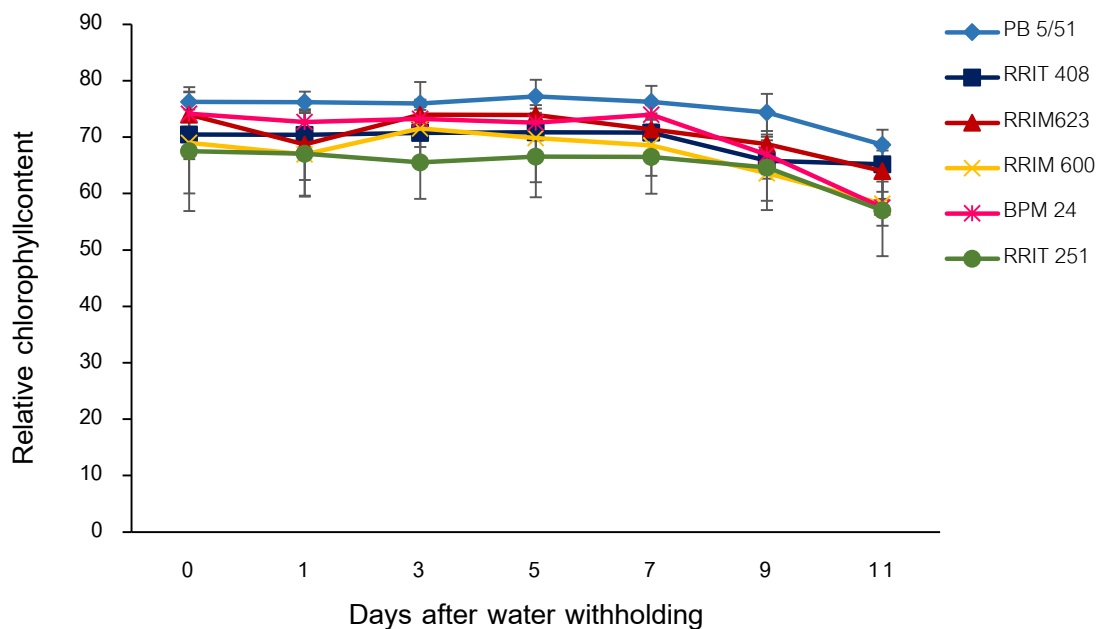
### 2.4 การศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์สัมพัทธ์ (Relative chlorophyll content)

จากการศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์สัมพัทธ์ในใบยางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำ พบว่า ก่อนทำการงดน้ำ ยางพาราทุกพันธุ์มีค่าปริมาณคลอโรฟิลล์ อยู่ที่ 67.5 - 76.25 ในช่วง 1 - 7 วันแรกของการงดน้ำ ปริมาณคลอโรฟิลล์ค่อนข้างคงที่ ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะสัญญาณวิทยาที่แสดงให้เห็นว่า ในสภาวะขาดน้ำยางพาราไม่ได้แสดงอาการใบเหลือง แต่แสดงอาการใบเหี่ยวแห้งที่ยังมีสีเขียวอยู่ หลังจากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล จนกระทั่งหลังจากการงดน้ำเป็นเวลา 9-11 วัน พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์มีค่าลดลงอย่างเห็นได้ชัด โดยในวันที่ 11 ของการงดน้ำ ยางพาราพันธุ์ PB 5/51

มีปริมาณคลอโรฟิลล์สัมพัทธ์มากที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 68.64 รองลงมาคือ ยางพาราพันธุ์ RRIT 408, RRIM 623, RRIM 600, BPM 24 และ RRIT 251 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 65.20, 63.96, 58.19, 57.51 และ 57 ตามลำดับ (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 10 ค่าประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงของต้นกล้ายางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำ เป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตามลำดับ

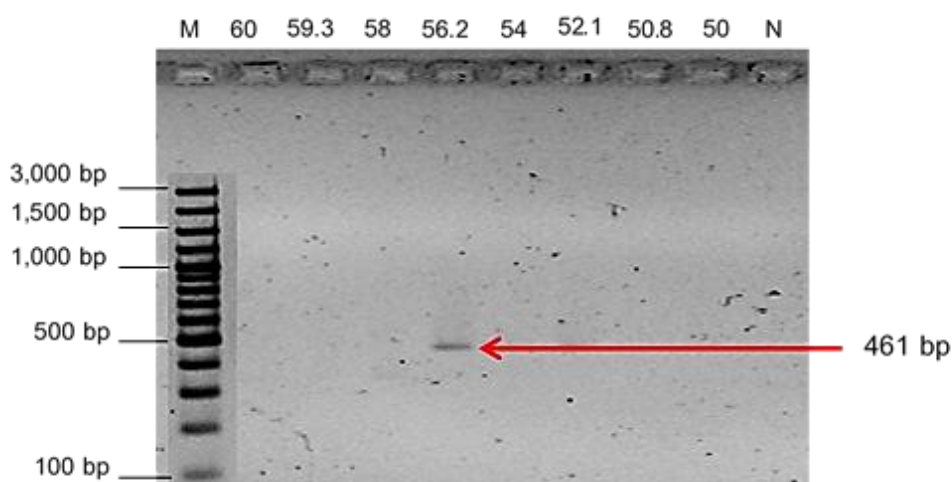


ภาพที่ 11 ปริมาณคลอโรฟิลล์สัมพัทธ์ของต้นกล้ายางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำ เป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตามลำดับ

### 3. การโคลนยีน *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED)*

#### 3.1 การหาลำดับเบสของยีน *NCED3* บางส่วน (partial sequencing) จาก cDNA ยางพาราโดยใช้ degenerated primers

ทำการออกแบบ degenerate primer โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NCED3* จากพืชชนิดอื่น จากการนำคู่ของไพรเมอร์ AF2 (sense) และ AR1 (antisense) มาสำหรับ amplification กับ cDNA ของยางพารา โดยการทำ gradient PCR เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 56.2 องศาเซลเซียส และได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 461 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 12) หลังจากนั้นทำการโคลนชิ้นส่วนของยีน *NCED3* ในยางพาราโดยใช้พลาสมิด TA cloning vector รวมเข้ากับยีน *NCED3* ส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์ของเชื้อ *E. coli* DH5 $\alpha$  ทำการตรวจสอบการถ่ายโอนยีน *NCED3* โดยเทคนิค PCR และตรวจสอบผลที่ได้ด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis เมื่อตรวจพบชิ้นส่วน DNA ในพลาสมิดที่ได้จากโคโลนีของเชื้อ *E.coli* ทำการเลี้ยงเชื้อ ในอาหารเหลว LB (ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 5 มิลลิลิตร ในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการสกัดพลาสมิดให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด Pure Quick plasmid DNA Miniprep kits และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis ทำการส่งตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NCED3* โดยการใช้ T7 เป็นโปรโมเตอร์ของเส้น forward



ภาพที่ 12 ผลการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จาก cDNA ส่วนใบของยางพารา อุณหภูมิที่เหมาะสมของไพรเมอร์ AF2 (forward primer) และ AR1 (reverse primer) คือ 56.2 องศาเซลเซียส และได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 461 นิวคลีโอไทด์ เมื่อเปรียบเทียบกับ GeneRuler 100 bp DNA Ladder (M)

จากการศึกษาการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NCED3* เพื่อตรวจสอบความใกล้เคียงทางพันธุกรรม พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NCED3* ของยางพารามีความใกล้เคียงกับยีน *NCED3* ของพืชอื่นๆ ค่าอนข้างสูง ได้แก่ สบู่ดำ (*Jatropha curcas*) สูงที่สุดถึง 86% และ (*Populus trichocarpa*) 83% แสดงให้เห็นว่าชิ้นส่วน PCR product ที่ทำการโคลนยีน เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *NCED3* ในยางพารา และสามารถแปลเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีขนาด 461 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 13)

```
5'ATGTCTGAGATGATTGCCTTACCATGTTCTGTTCTTCCCTCTGGCGACCTCAAACCT
GTCGGGCGAAACAATTTCAATGGCCAACTCAAGAGTACAATGATTGCTCATCCAAAAG
TCGACCCATCTTCTGGGGAATTGTTTGTCTTAGCTACGATGTTGTCCAGAAGCCATAT
CTGAAATATTTCAAGATTTTCTGCCGATGGTAAAAAGTCTCCTGATGTTGAAATCTCACTT
GATCAACCAACCATGATGCATGATTTTGCCATTACTGAGAGGTTCTGTTGTTATTCCTGAT
CAACAAATAGTGTTCAAATTGCCCGAAATGATTTGCGGTGGCTCACCGGTAATCTACGA
CAAGAAGAAGATGTCAAGGTTTGGGGTATTGGAAAAGAAAGCCAATGACGCTTCCAAG
ATTAGGTGGATGGATGCGCCTGATTGCTTCTGTTTCCATCTCTGGAAA 3'
```

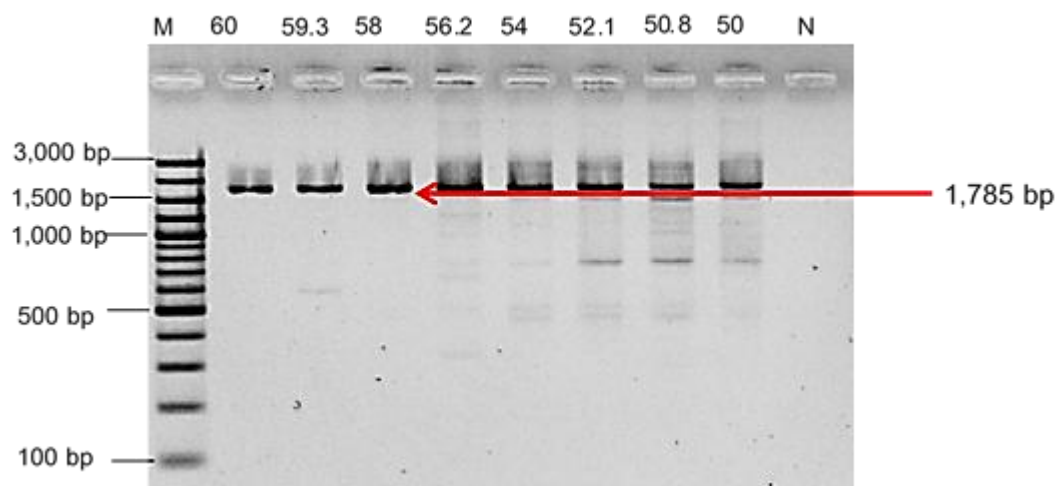
ภาพที่ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NCED3* บริเวณส่วนกลางยีน ขนาด 461 นิวคลีโอไทด์

### 3.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NCED3* full length ของยางพารา

ทำการหาลำดับเบสของยีน *NCED3* ด้วยการออกแบบ degenerate primers จากข้อมูลลำดับเบสของยีน *NCED3* ในพืชอื่นมาทำการวิเคราะห์ multiple alignment ด้วยโปรแกรม GENETYX-WIN version 5.0 โดยค้นหาข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ซึ่งพืชที่นำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NCED3* ในยางพาราเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae ได้แก่ สบู่ดำ และละหุ่ง ซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกันกับยางพาราซึ่งผลที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขั้นแรกคือ การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยาของไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยการทำ gradient PCR พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการนำมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับ cDNA ของยางพารา คือ อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 14) ในขั้นต่อนำมาทำการนำไพรเมอร์ FNCE3 (forward primer) และ RNCE3 (reverse primer)



มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ปกติใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่ 58 องศาเซลเซียส ผลของการทำปฏิกิริยาของพีซีอาร์ได้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเท่ากับ 1,785 นิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน หลังจากนั้นสกัดแยกผลผลิตพีซีอาร์ออกจากเจลโดยใช้ E.Z.N.A<sup>®</sup> Gel Extraction Kit นำดีเอ็นเอที่ได้เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ RBC TA cloning ทำการถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอซึ่งมีขนาด 1,785 นิวคลีโอไทด์ ทำการคัดเลือกโคโลนีสีขาวขึ้น เพื่อตรวจสอบชิ้นส่วนของยีน *NCED3* ที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ RBC TA cloning (pTA- *NCED3*) ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์พบขนาดของชิ้นส่วนยีนประมาณ 1,785 นิวคลีโอไทด์ คัดเลือกโคโลนีที่ต้องการนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มาสกัดแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอสายผสม pTA- *NCED3* ออกจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  โดยใช้ E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid DNA Mini Kit I ตรวจสอบปริมาณ และความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอสายผสม pTA-*NCED3* ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง และนำดีเอ็นเอสายผสม pTA-*NCED3* ที่สกัดได้มาตรวจสอบด้วยวิธีการอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน นำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ universal primer คือ T7 promoter เป็น forward primer และ M13 เป็น reverse primer



**ภาพที่ 14** ผลการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จาก cDNA ส่วนไบของยางพารา อุณหภูมิที่เหมาะสมของไพรเมอร์ F*NCED3* (forward primer) และ R*NCED3* (reverse primer) คือ 58 องศาเซลเซียส และได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,785 นิวคลีโอไทด์ เมื่อเปรียบเทียบกับ GeneRuler 100 bp DNA Ladder (M)



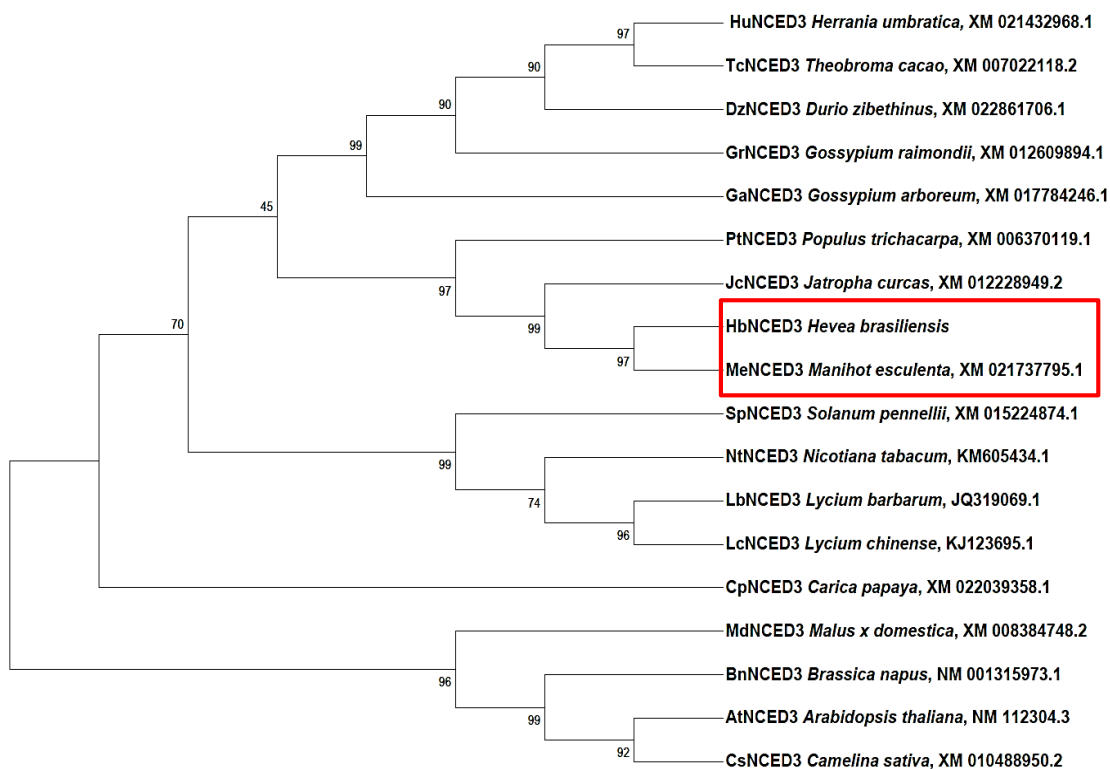
จากการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์เส้นสมบูรณ์ของยีน *NCED3* ของยางพารา พบว่า ยีน *NCED3* มีขนาด (open reading frame) 1,785 คู่เบส (ภาพที่ 15) เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NCED3* ในยางพารา ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NCED3* ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม nucleotide blast พบว่า ยีน *NCED3* ที่สังเคราะห์ได้จากส่วนใบของยางพารามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NCED3* ของมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*, XP 021593487), สบู่ดำ (*Jatropha curcas*, XP 012084339), พืช (*Populus trichocarpa*, XM006370119), ทูเรียน (*Durio zibethinus*, XP 022717441) และ โกโก้ (*Theobroma cacao*, XP 007022180) ดังแสดงในตารางที่ 3 *HbNCED3* มีหน้าที่การทำงานที่คล้ายคลึงกับยีน *NCED3* ในพืชอื่นๆ ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NCED3* ที่ได้กับฐานข้อมูลของ GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกับยีน *NCED3* ของมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) 91 เปอร์เซ็นต์ สบู่ดำ (*Jatropha curcas*) 83 เปอร์เซ็นต์ พืช *Populus trichocarpa*) 82 เปอร์เซ็นต์ ทูเรียน (*Durio zibethinus*) 79 เปอร์เซ็นต์ และโกโก้ (*Theobroma cacao*) 78 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *HbNCED3* จากกรดอะมิโน โดยการสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี neighborhood joining method เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของยีน *HbNCED3* กับพืชอื่นๆ ในฐานข้อมูล GenBank พบว่า โปรตีน *NCED3* ในยางพารามีสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการคล้ายกับมันสำปะหลังมากที่สุด (ภาพที่ 16)

**ตารางที่ 3** ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NCED3* ของยางพารากับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม nucleotide blast

Accession number	Plants	Identity score (%)
XP 021593487	<i>Manihot esculenta</i>	91
XP 012084339	<i>Jatropha curcas</i>	83
XM006370119	<i>Populus trichocarpa</i>	82
XP 022717441	<i>Durio zibethinus</i>	79
XP 007022180	<i>Theobroma cacao</i>	78

MeNCED3	MASSSSLSPAALISMS-----SSVSTDRF-----SIISSSLCTPSILHHPKHSSTATSYPPSPSISTTIIPKAIATT-LRPSVDK	: 72
JcNCED3	MASTAP----PAITMG-----SSISIGHF-----SRKFNVTCSLCTPSILHHPKOSRTRATYPPSSAISSTTNSPINK-SSSTDI	: 71
HbNCED3	MAS-----ATISM-----SSISIDARASTKLNISSSLHETPSILHHPKOSPRRTSFPPSPSISTTIIPKAVTLPPAPSVDR	: 71
DzNCED3	MAS--YASASTAAATCNCVKPKFLVSNSSSSPDSSPISSSIPFKHF-----SRKSNISCSLCTPSILHHPKOSP---TYPPSPSPASSPTSKHPKN-ISTTEK	: 92
TcNCED3	MASSASASAAVPAATCNCCLKPKFPPTSSSSAPDLGSISSSIPLRFH-----TRKFNISCSLCTPSILHHPKOSP---TYPPSPSPASSPTSKHPKN-TSABEK	: 94
MeNCED3	SLAPVQNCWNLQKAAAMALDAVESALVSHERRFPLPKTADRFVQIAGNFAPVPECPVVENLPTVGTIPDITRGVYVRNAGANPLHEPVAGHHFFDGDGMV	: 172
JcNCED3	SVPP---EWNLQKAAAMALDAVESALVSHERRFPLPKTADRFVQIAGNFAPVPECPVVRDLPTVGTIPDITRGVYLRNAGANPLHEPVAGHHFFDGDGMV	: 168
HbNCED3	SLAPEINCWNLQKAAAMALDAVESALVSHENQVPLPKTADRFVQIAGNFAPVPECPVVENLPTVGTIPDITRGVYLRNAGANPLHEPVAGHHFFDGDGMV	: 171
DzNCED3	TQSQ---QVNPQRRAAMALDVVENALVSHERRFPLPKTADRFVQIAGNFAPVPECPVVEHLPTVGTIPDITRGVYVRNAGANPLHEPVAGHHFFDGDGMV	: 189
TcNCED3	PQSQ---QVNPQRRAAMALDVVENALVSHERRFPLPKTADRFVQIAGNFAPVPECPVVEHLPTVGTIPDITRGVYVRNAGANPLHEPVAGHHFFDGDGMV	: 191
<b>α-helix</b>		
MeNCED3	HAVRFEKGSVSYACRFETENRLVQEREGRVFPKAIAGELHGHSGIARLLLFARGLFGIVDLSHGCTGVANAGLVYFDGRIILAMSEDDLPHYHVRVITPSGD	: 272
JcNCED3	HAVRFEKGSVSYACRFETENRLVQEREGRVFPKAIAGELHGHSGIARLLLFARGLFGIVDLSHGCTGVANAGLVYFNGRIILAMSEDDLPHYHVRVITPSGD	: 268
HbNCED3	HAVRFEKGSVSYACRFETENRLVQEREGRVFPKAIAGELHGHSGIARLLLFARGLFGIVDLSHGCTGVANAGLVYFNGRIILAMSEDDLPHYHVRVITPSGD	: 271
DzNCED3	HAVRFEKGSVSYACRFETENRLVQEREGRVFPKAIAGELHGHSGIARLLLFARGLFGIVDLSHGCTGVANAGLVYFNGRIILAMSEDDLPHYHVRVITPSGD	: 289
TcNCED3	HAVRFEKGSVSYACRFETENRLVQEREGRVFPKAIAGELHGHSGIARLLLFARGLFGIVDLSHGCTGVANAGLVYFNGRIILAMSEDDLPHYHVRVITPSGD	: 291
MeNCED3	LKTVGRVNFNGQLKSTMIHAPKVDPEFSGELFALSVDVQKPYLYKFFRFSPIGCRKSEDDVEHSLDPTMMHDFAITERFVVIIDQQIVFKLEPMIRGGSPVI	: 372
JcNCED3	LKTVGRVNFNGQLKSTMIHAPKVDPEFSGELFALSVDVQKPYLYKFFRFSPIGCRKSEDDVEHSLDPTMMHDFAITERFVVIIDQQIVFKLEPMIRGGSPVI	: 368
HbNCED3	LKTVGRVNFNGQLKSTMIHAPKVDPEFSGELFALSVDVQKPYLYKFFRFSPIGCRKSEDDVEHSLDPTMMHDFAITERFVVIIDQQIVFKLEPMIRGGSPVI	: 371
DzNCED3	LKTVGRVDFNGQLKSTMIHAPKVDPEFSGELFALSVDVQKPYLYKFFRFSPIGCRKSEDDVEHSLDPTMMHDFAITERFVVIIDQQIVFKLEPMIRGGSPVV	: 389
TcNCED3	LKTVGRVDFNGQLKSTMIHAPKVDPEFSGELFALSVDVQKPYLYKFFRFSPIGCRKSEDDVEHSLDPTMMHDFAITERFVVIIDQQIVFKLEPMIRGGSPVV	: 391
MeNCED3	YDRKRMRSRFGVLEKRNATASKIRWVEAPDCFCFHLWNAWEEETDEIVVIGSCMTPPDSIFNECDESLKSVLSEIRLNLKTKGSTRRPIISESGVQNLEA	: 472
JcNCED3	YDRKRMRSRFGVLEKRNATASKIRWVEAPDCFCFHLWNAWEEETDEIVVIGSCMTPPDSIFNECDESLKSVLSEIRLNLKTKGSTRRPIISESGVQNLEA	: 468
HbNCED3	YDRKRMRSRFGVLEKRNATASKIRWVEAPDCFCFHLWNAWEEETDEIVVIGSCMTPPDSIFNECDESLKSVLSEIRLNLKTKGSTRRPIISESGVQNLEA	: 471
DzNCED3	YDRKRMRSRFGVLEKRNATASKIRWVEAPDCFCFHLWNAWEEETDEIVVIGSCMTPPDSIFNECDESLKSVLSEIRLNLKTKGSTRRPIISESGVQNLEA	: 489
TcNCED3	YDRKRMRSRFGVLEKRNATASKIRWVEAPDCFCFHLWNAWEEETDEIVVIGSCMTPPDSIFNECDESLKSVLSEIRLNLKTKGSTRRPIISESGVQNLEA	: 491
MeNCED3	GMVNRNLLGRKTRFAYLALAEPPWPKVSGFAKVDLSTGEVRYKYMG--NRYGGEPLFLPSDPPSSNSCHEDSGYIICFVHDEKQKSELQIVNANNLGLEATV	: 571
JcNCED3	GMVNRNLLGRKTRFAYLALAEPPWPKVSGFAKVDLSTGEVRYKYMG--NRYGGEPLFLPSDPPSSNSCHEDSGYIICFVHDEKQKSELQIVNANNLGLEATV	: 565
HbNCED3	GMVNRNLLGRKTRFAYLALAEPPWPKVSGFAKVDLSTGEVRYKYMG--NRYGGEPLFLPSDPPSSNSCHEDSGYIICFVHDEKQKSELQIVNANNLGLEATV	: 571
DzNCED3	GMVNRNLLGRKTRFAYLALAEPPWPKVSGFAKVDLSTGEVRYKYMG--NRYGGEPLFLPSDPPSSNSCHEDSGYIICFVHDEKQKSELQIVNANNLGLEATV	: 587
TcNCED3	GMVNRNLLGRKTRFAYLALAEPPWPKVSGFAKVDLSTGEVRYKYMG--NRYGGEPLFLPSDPPSSNSCHEDSGYIICFVHDEKQKSELQIVNANNLGLEATV	: 589
MeNCED3	KLPSRVPYGFHGTFFISAKDLEKQA	: 595
JcNCED3	KLPSRVPYGFHGTFFISAKDLEKQA	: 589
HbNCED3	KLPSRVPYGFHGTFFISAKDLEKQA	: 595
DzNCED3	KLPSRVPYGFHGTFFISAKDLEKQA	: 611
TcNCED3	KLPSRVPYGFHGTFFISAKDLEKQA	: 613

ภาพที่ 15 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนโปรตีน *NCED3* ของยางพารากับ *Manihot esculenta* (*MeNCED3*, XM021737795.1), *Jatropha curcas* (*JcNCED3*, XM01228949.2), *Durio zibethinus* (*DzNCED3*, XM022861706.1) และ *Theobroma cacao* (*TcNCED3*, XM007022118.2) จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม GeneDoc

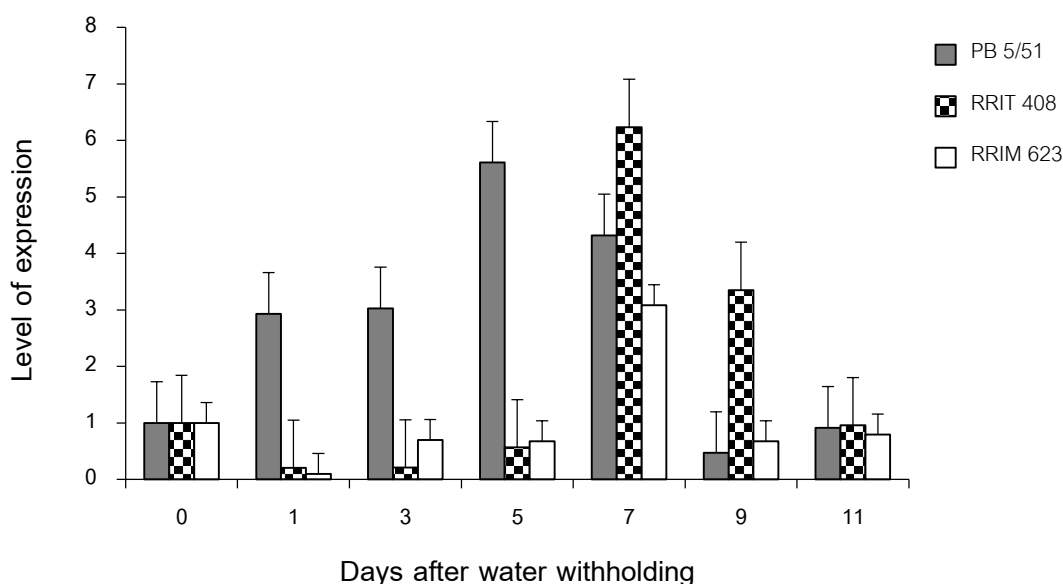


ภาพที่ 16 แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของโปรตีน NCED3 จากยางพารา กับโปรตีน NCED3 ในพืชอื่นๆ 17 ชนิด จาก GenBank ด้วยโปรแกรม MEGA 6 ตัวเลขบนแขนง (node) แสดงเปอร์เซ็นต์ความน่าเชื่อถือจากการคำนวณด้วย bootstrap root test จำนวน 1,000 รอบ โดยมีเลข accession number ดังนี้ *Herrania umbratica* (HuNCED3, XM021432968.1), *Theobroma cacao* (TcNCED3, XM007022118.2), *Durio zibethinus* (DzNCED3, XM022861706.1), *Gossypium raimondii* (GrNCED3, XM012609894.1), *Gossypium arboreum* (GaNCED3, XM017784246.1), *Populus trichacarpa* (PtNCED3, XM006370119.1), *Manihot esculenta* (MeNCED3, XM021737795.1), *Solanum pennellii* (SpNCED3, XM015224874.1), *Nicotiana tabacum* (NtNCED3, KM605434.1), *Lycium barbarum* (LbNCED3, JQ319069.1), *Lycium chinense* (LcNCED3, KJ123695.1), *Carica papaya* (CpNCED3, XM022039358.1), *Malus x domestica* (MdNCED3, XM008384748.2), *Brassica napus* (BnNCED3, NM001315973.1), *Arabidopsis thaliana* (AtNCED3, NM112304.3), *Camellina sativa* (CsNCED3, XM010488950.2)

#### 4. การแสดงออกของยีน *NCED3* ภายใต้สภาวะขาดน้ำในต้นกล้ายางพารา

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *NCED3* โดยใช้ไพรเมอร์ที่ผ่านการตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงมาแล้ว ได้แก่ qRT-*NCED3*\_F3 forward primer และ qRT-*NCED3*\_R3 reverse primer มาใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *NCED3* ในชิ้นส่วนใบ ของต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIT 408, RRIM 623 และ PB 5/51 ภายใต้สภาวะขาดน้ำ ที่ 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วันตามลำดับ โดยใช้ยีน 18s rRNA เป็นยีนอ้างอิง

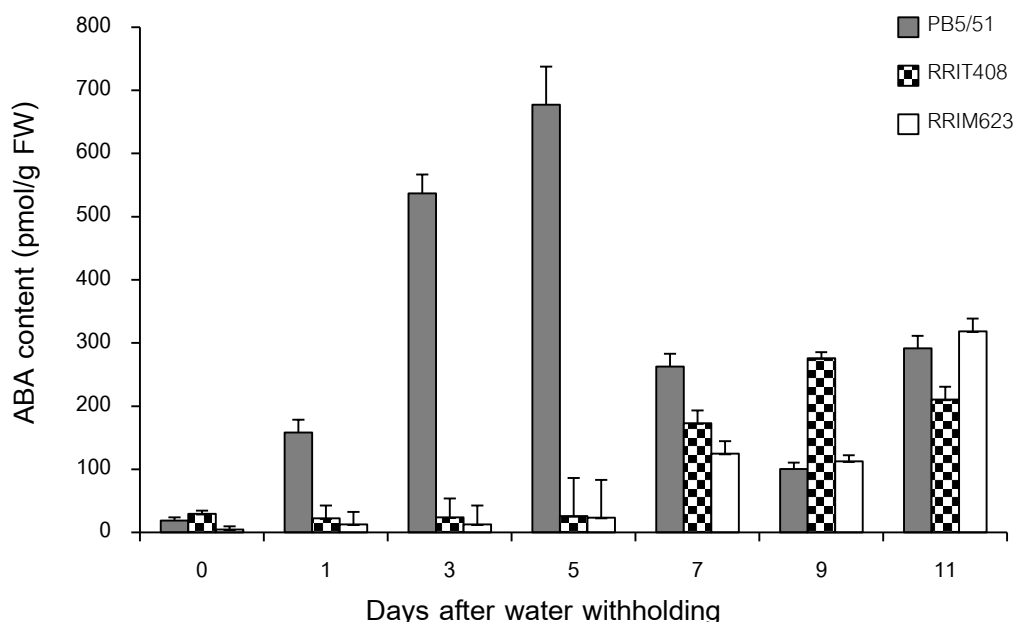
จากผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *NCED3* ของต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIT 408, RRIM 623 และ PB 5/51 โดยเทคนิค qRT-PCR พบว่า ยางพาราพันธุ์ RRIT 408 และ RRIM 623 มีระดับการแสดงออกของยีน *NCED3* ค่อนข้างคงที่ ในวันที่ 0, 1, 3 และ 5 ของการงดน้ำ และเพิ่มขึ้นสูงสุดหลังจากทำการงดน้ำเป็นเวลา 7 วัน ดังภาพที่ 17 ยางพาราพันธุ์ PB 5/51 มีการแสดงออกของยีน *NCED3* เพิ่มขึ้น หลังจากทำการงดน้ำตั้งแต่วันที่ 1 และเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 5 หลังจากนั้นการแสดงออกของยีน *NCED3* ลดลงอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะในวันที่ 9 อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีน *NCED3* ในยางพาราพันธุ์ RRIT 408 และ PB 5/51 มีการแสดงออกที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับยางพาราพันธุ์ RRIM 623



ภาพที่ 17 ระดับการแสดงออกของยีน *NCED3* จากชิ้นส่วนใบ ของต้นกล้ายางพาราพันธุ์ PB 5/51, RRIT 408 และ RRIM 623 ภายใต้สภาวะขาดน้ำ เป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตามลำดับ

## 5. ปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกทั้งหมด ภายใต้สภาวะขาดน้ำของต้นกล้ายางพารา

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *NCED3* และปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิก จึงนำต้นกล้ายางพาราพันธุ์ PB 5/51, RRIT 408 และ RRIM 623 ซึ่งใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนมาวิเคราะห์ปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกด้วย โดยวิเคราะห์ปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกจากตัวอย่างใบยางพาราที่ทำการงดน้ำในระยะเวลาที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตามลำดับ จากการทดลองปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกในใบยางพารา พบว่า ต้นกล้ายางพาราพันธุ์ PB 5/51 มีปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกในช่วงแรกของการขาดน้ำ ตั้งแต่วันที่ 1 ของการงดน้ำและมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง มีปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกสูงที่สุดในวันที่ 5 ของการงดน้ำ หลังจากนั้นปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกจึงลดปริมาณลง ในขณะที่เดียวกันต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIT 408 และ RRIM 623 มีปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกที่ต่ำกว่า โดยมีการเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในวันที่ 7 ของการงดน้ำ ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกของยีน *NCED3* โดยต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIT 408 มีปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกที่สูงกว่าต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIM 623 ในช่วงแรกของการงดน้ำ (3 และ 5 วันหลังการงดน้ำ) ดังภาพที่ 18



ภาพที่ 18 ปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกของต้นกล้ายางพาราพันธุ์ PB 5/51, RRIT 408 และ RRIM 623 ภายใต้สภาวะขาดน้ำ เป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตามลำดับ

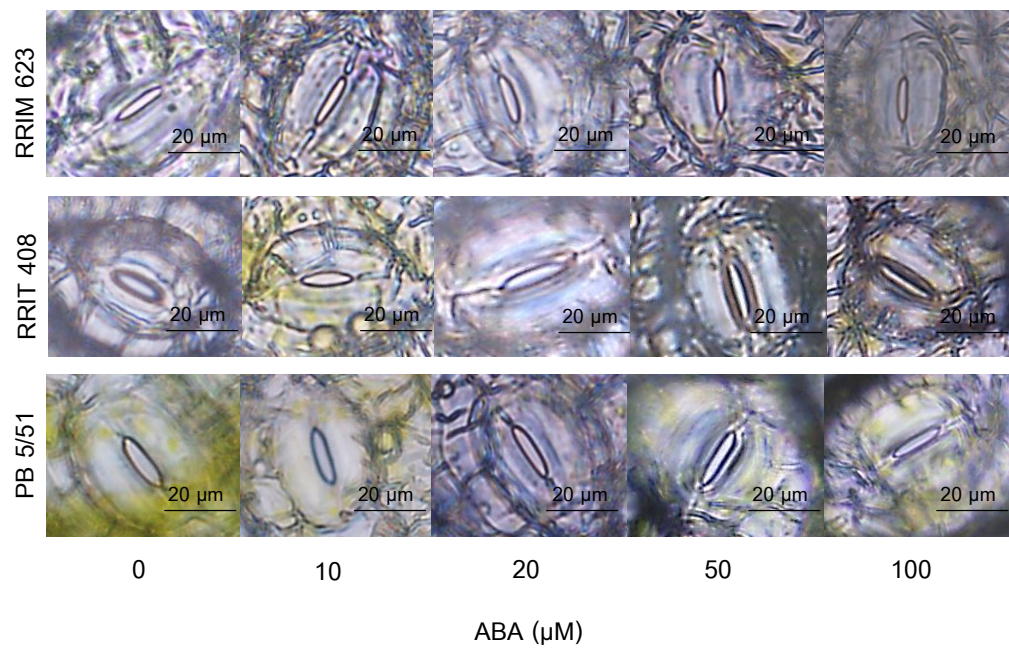
## 6. การตอบสนองของปากใบยางพาราต่อกรดแอบไซซิก

จากการตรวจสอบการตอบสนองของปากใบต่อปริมาณกรดแอบไซซิกในยางพารา 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ RRIM 623, RRIT 408 และ PB 5/51 โดยการแช่ใบที่ติดอยู่บนลำต้น (intact leaves) ของยางพาราในสารละลายบัฟเฟอร์ (10mM KCl, 7.5mM iminodiacetic acid และ 10 mM MES hydrate, ปรับ pH 6.2 ด้วย KOH) เพื่อกระตุ้นให้ปากใบเปิดอย่างเต็มที่ หลังจากนั้นจึงนำมาแช่สารละลายกรดแอบไซซิก ที่ความเข้มข้นในระดับต่างๆ ได้แก่ 0, 10, 20, 50 และ 100  $\mu\text{M}$  พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายกรดแอบไซซิกเดียวกัน ยางพาราพันธุ์ RRIM 623 จะมีความกว้างของปากใบ (stomatal aperture) ที่มีขนาดเล็กกว่ายางพาราพันธุ์ RRIT 408 และ PB 5/51 โดยสังเกตได้จากภาพที่ 19 ที่ไม่มีการแช่สารละลายกรดแอบไซซิก (0  $\mu\text{M}$  ABA) ส่วนยางพาราพันธุ์ RRIT 408 และ PB 5/51 มีการตอบสนองต่อกรดแอบไซซิกในการปิดปากใบที่ใกล้เคียงกัน

**ตารางที่ 4** ความกว้างของปากใบ (stomatal aperture) ในต้นกล้ายางพารา 3 พันธุ์ ต่อกรดแอบไซซิก ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 20, 50 และ 100  $\mu\text{M}$

Clones	Stomatal aperture ( $\mu\text{m}$ )				
	0 $\mu\text{M}$ ABA	10 $\mu\text{M}$ ABA	20 $\mu\text{M}$ ABA	50 $\mu\text{M}$ ABA	100 $\mu\text{M}$ ABA
RRIM 623	1.39 $\pm$ 0.07	1.24 $\pm$ 0.08	1.13 $\pm$ 0.22	1.08 $\pm$ 0.07	0.95 $\pm$ 0.05
RRIT 408	1.75 $\pm$ 0.55	1.65 $\pm$ 0.47	1.50 $\pm$ 0.31	1.48 $\pm$ 0.51	1.31 $\pm$ 0.50
PB 5/51	2.36 $\pm$ 0.55	2.35 $\pm$ 0.41	2.29 $\pm$ 0.52	2.19 $\pm$ 0.16	1.50 $\pm$ 0.07

จากการศึกษาการตอบสนองของปากใบต่อปริมาณกรดแอบไซซิกที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 20, 50 และ 100  $\mu\text{M}$  ในยางพารา 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ RRIM 623, RRIT 408 และ PB 5/51 พบว่า ในทุกๆ ระดับความเข้มข้นของกรดแอบไซซิก ยางพาราพันธุ์ RRIM 623 มีระดับความกว้างของปากใบ (stomatal aperture) ที่มีขนาดเล็กที่สุด รองลงมาคือ ยางพาราพันธุ์ RRIT 408 และ PB 5/51 โดยสังเกตได้จากที่ระดับความเข้มข้นของกรดแอบไซซิก 0  $\mu\text{M}$  ยางพาราพันธุ์ RRIM 623 มีระดับความกว้างของปากใบ (stomatal aperture) ที่น้อยที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.39  $\mu\text{m}$  รองลงมาคือ ยางพาราพันธุ์ RRIT 408 และ PB 5/51 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.75 และ 2.36  $\mu\text{m}$  ตามลำดับ (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 19 การตอบสนองของปากใบในยางพาราพันธุ์ RRIM 623, RRIT 408 และ PB 5/51 ต่อปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกที่ความเข้มข้นในระดับต่างๆ ได้แก่ 0, 10, 20, 50 และ 100  $\mu\text{M}$

## บทที่ 4

### วิจารณ์

#### 1. การตอบสนองทางลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นกล้ายางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำ

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นกล้ายางพารา 6 พันธุ์ ที่ทำการงดน้ำ ในระยะเวลาต่างๆ หลังจากทำการงดน้ำในช่วง 3 วันแรก ต้นกล้ายางพาราทั้ง 6 พันธุ์ยังคงอยู่ในสภาพปกติไม่พบอาการขาดน้ำหรือการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา แต่หลังจากงดน้ำเป็นเวลา 5 วัน พบว่า ปริมาณความชื้นดินลดลง และค่อนข้างคงที่เมื่อทำการงดน้ำเป็นเวลา 7-11 วัน ปริมาณความชื้นในดินที่ลดลงส่งผลให้พืชเกิดสภาวะขาดน้ำ ในต้นกล้ายางพารามีอาการขาดน้ำ โดยแสดงลักษณะใบเหี่ยว จนกระทั่งในวันที่ 11 หลังจากงดน้ำ ต้นกล้ายางพาราแสดงอาการขาดน้ำ อย่างรุนแรงและสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน โดยลักษณะอาการที่พบ คือ อาการเหี่ยวของใบ ก้านใบ และปลายยอดตามลำดับ ลักษณะการเหี่ยวดังกล่าวเกิดขึ้นก่อนกับต้นกล้ายางพาราพันธุ์ PB 5/51, BPM 24, RRIM 600, RRIT 251, RRIT 408, และ RRIM 623 ตามลำดับ ต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIT 408 และ RRIT 251 แสดงอาการเหี่ยวของแผ่นใบหลังการงดน้ำเป็นเวลา 7 วัน และมุมใบเริ่มเปลี่ยนหลังการงดน้ำเป็นเวลา 9 วัน ต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIM 600, BPM 24 และ PB 5/51 แสดงอาการเหี่ยวของแผ่นใบหลังการงดน้ำเป็นเวลา 5 วัน และมุมใบเริ่มเปลี่ยนหลังงดน้ำเป็นเวลา 7 วัน และในขณะเดียวกันต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIM 623 แสดงอาการเหี่ยวของแผ่นใบหลังการงดน้ำเป็นเวลา 9 วัน และมุมใบเริ่มเปลี่ยนเล็กน้อยหลังงดน้ำเป็นเวลา 11 วัน ซึ่งช้ากว่าพันธุ์อื่นๆ จึงอาจมีแนวโน้มเป็นพันธุ์ที่ค่อนข้างทนต่อสภาวะขาดน้ำ หลังจากสิ้นสุดการงดน้ำเป็นเวลา 11 วัน ได้ทำการให้น้ำแก่ต้นกล้ายางพาราทุกพันธุ์อีกครั้ง พบว่า ต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIM 623 มีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 100% ภายใน 1 สัปดาห์ หลังจากได้รับน้ำอีกครั้ง ส่วนต้นกล้ายางพาราพันธุ์ PB 5/51 มีอัตราการรอดชีวิตเพียงแค่ 55% ภายใน 2 สัปดาห์ ปริญญาภรณ์ และคณะ (2549) ได้ศึกษาผลของสภาวะเครียดน้ำที่มีผลต่อต้นส้มเปลือกอ่อนพันธุ์ฮันนี่ (*Citrus reticulata* Blanco cv.Honey) ตามระยะเวลาการงดน้ำ 7, 14, 21, 28 และ 35 วัน ตามลำดับ พบว่า ต้นส้มที่ขาดน้ำในช่วงระยะเวลาสั้นเกิน 14 วัน จะเริ่มแสดงอาการเหี่ยว ในขณะที่ต้นส้มที่งดน้ำ 7 วัน ไม่แสดงอาการเนื่องจากเกิดสภาวะขาดน้ำมีลักษณะปกติเช่นเดียวกับต้นควบคุม ลักษณะอาการขาดน้ำทางสัณฐานวิทยาภายนอกสามารถบ่งบอกถึงสภาวะขาดน้ำได้ โดยสังเกต



จากการม้วนห่อ การเหี่ยวของใบและอาการใบเหลือง พืชจะแสดงความรุนแรงมากขึ้นเมื่อมีระยะเวลาในการขาดน้ำยาวนานขึ้น นอกจากนี้การตรวจสอบการตอบสนองทางสรีรวิทยา ยังพบว่า มีความสัมพันธ์กับความชื้นดิน และปริมาณน้ำในใบ เมื่อความชื้นดินลดลงต้นกล้า ยางพาราเกิดอาการขาดน้ำ ส่งผลให้ปริมาณน้ำในใบลดลงด้วย แสดงให้เห็นได้อย่างชัดเจนจาก ลักษณะอาการเหี่ยวของต้นกล้ายางพารา

## 2. การตอบสนองทางด้านสรีรวิทยาของต้นกล้ายางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำ

การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยาเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและ พัฒนาการของพืช หากพืชได้รับผลกระทบจากสภาวะขาดน้ำ (Wang *et al.*, 2001) น้ำที่อยู่ในพืช มีปริมาณน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำที่ถูกดูดขึ้นไปจากดินผ่านต้นพืช และสูญเสียออกโดยการคายน้ำ ความชื้นดินที่ลดลงส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของระดับน้ำในพืช หากต่ำกว่าระดับที่เหมาะสม (optimum level) จะทำให้พืชสูญเสียความเต่งของเซลล์หรือมีอาการเหี่ยว ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อ กระบวนการทางสรีรวิทยา จากการทดลองพบว่า ปริมาณความชื้นดินภายในภาชนะปลูกของ ต้นกล้ายางพาราแต่ละพันธุ์ในทุกช่วงเวลา 1 - 5 วัน ของการรดน้ำ ปริมาณความชื้นในดินมีค่า ใกล้เคียงกัน แต่หลังจากรดน้ำเป็นเวลา 7 - 11 วัน ปริมาณความชื้นดินลดลงค่อนข้างคงที่ เมื่อปริมาณน้ำในดินลดลงปริมาณน้ำที่เข้าสู่ต้นพืชต่ำกว่าปริมาณน้ำที่ออกจากต้นพืช ส่งผลให้ ปริมาณน้ำในใบลดลง พืชสูญเสียความเต่งของเซลล์หรือแสดงอาการเหี่ยวดังกล่าวข้างต้น โดย ค่าปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อระยะเวลาการขาดน้ำยาวนานขึ้น จากการศึกษา ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบของต้นกล้ายางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำ พบว่า ในการรดน้ำเป็นเวลา 0 - 5 วันแรก ต้นกล้ายางพาราทุกพันธุ์มีปริมาณน้ำสัมพัทธ์ที่ไม่แตกต่างกันโดยมีค่าอยู่ระหว่าง 74.27 - 93.08 % แต่เมื่อทำการรดน้ำเป็นเวลา 7, 9 และ 11 วัน ตามลำดับ ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องและมีค่าต่ำสุดถึง 21.52% ในต้นกล้ายางพาราพันธุ์ PB 5/51 ซึ่งสอดคล้อง กับการศึกษาของ ปรียานุช และคณะ (2558) ที่ศึกษาการทนแล้งของข้าว โดยทำการรดน้ำเป็นเวลา 20 และ 40 วัน พบว่า ปริมาณน้ำสัมพัทธ์มีค่าลดลง ในข้าวกลุ่มที่ได้รับสภาวะขาดน้ำ และการทดลอง ของ Wang (2014) ที่ศึกษาการตอบสนองทางสรีรวิทยาของยางพาราพันธุ์ GT1 ที่มีการเจริญเติบโต ของใบจำนวน 2 คู่ ภายใต้สภาวะขาดน้ำ โดยเปรียบเทียบชุดควบคุมและชุดที่ทำการรดน้ำเป็น เวลา 7 วัน พบว่า ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบลดลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังส่งผลให้เกิดการ รั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์เพิ่มมากขึ้น แสดงให้เห็นถึงความเสียหายของเซลล์พืชที่ได้รับ

ผลกระทบจากอาการขาดน้ำ จากผลการทดลองในใบยางพาราเกิดการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 1 ของการงดน้ำ โดยเฉพาะในต้นกล้ายางพาราพันธุ์ BPM 24 และ PB 5/51 เมื่อทำการงดน้ำเป็นเวลา 7 วัน และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 11 ของการงดน้ำ มากกว่าพันธุ์อื่นๆ ส่วนต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIM 623 มีปริมาณการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์น้อยที่สุด หลังจากทำการงดน้ำเป็นเวลา 9 วัน แสดงให้เห็นว่า ต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIM 623 มีความสามารถในการรักษาสภาพเซลล์ภายใต้สภาวะขาดน้ำได้มากกว่าต้นกล้ายางพาราพันธุ์อื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้ายางพาราที่แสดงอาการเหี่ยวน้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์อื่นๆ จึงทำให้ต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIM 623 มีแนวโน้มในการทนต่อสภาวะแล้งได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ นิตาชาล และคณะ (2555) ที่ศึกษาเกี่ยวกับการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ของใบอ้อย 10 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำ การวิจัยพบว่าเกิดการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์เพิ่มมากขึ้น เมื่ออ้อยได้รับผลกระทบจากสภาวะขาดน้ำในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้น เช่นเดียวกับการศึกษาการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ในข้าวที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำ ในต้นข้าวที่มีอายุ 28 วัน จำนวน 5 พันธุ์ ได้แก่ ปทุมธานี 1, ดอกมะลิ 105, กข 31, กข 41 และ กข 47 ทำการงดน้ำ เป็นเวลา 10 วัน มีผลทำให้การรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ ภายในรากและใบเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกรให้น้ำปกติ (คงเอก, 2558) นอกจากนี้การรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ในต้นกล้ายางพารา 6 พันธุ์ มีค่าสัมพันธ์กับลักษณะอาการเหี่ยวของใบ และในทางกลับกันพบปริมาณคลอโรฟิลล์สัมพันธ์ในใบของต้นกล้ายางพาราค่อนข้างคงที่ เนื่องจากหลังการงดน้ำ พบอาการใบเหี่ยวแต่ไม่มีการเปลี่ยนสีเป็นสีเหลือง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Wang (2014) ที่ทำการศึกษการตอบสนองทางสรีรวิทยาในยางพาราพันธุ์ GT1 ในสภาวะขาดน้ำ พบว่า ยางพาราพันธุ์ดังกล่าว มีปริมาณน้ำสัมพันธ์ในใบลดลง แต่ปริมาณคลอโรฟิลล์ ในช่วงที่มีการงดน้ำค่อนข้างคงที่ ซึ่งแตกต่างจากพืชอื่น Cha-um *et al.* (2010) รายงานว่ารวงควัดฤดูภายในใบของข้าวพันธุ์หอมจันทร์ ปทุมธานี 1 และ กข 6 มีปริมาณรวงควัดฤดูลดลง เมื่อได้รับสภาวะขาดน้ำ ซึ่งส่งผลทำให้การเจริญเติบโตของข้าวทั้ง 3 พันธุ์ ลดลง เช่นเดียวกับการศึกษาในหญ้าที่ได้รับสภาวะขาดน้ำเป็นเวลา 18 วัน พบว่ามีค่าปริมาณน้ำลดลงถึง 20% อีกทั้งปริมาณคลอโรฟิลล์มีค่าลดลงเป็นอย่างมาก (Mohsenzadeh *et al.*, 2006)

พืชที่อยู่ในสภาวะขาดน้ำมีการลดลงของปริมาณน้ำในใบพืช เมื่อพืชขาดน้ำก็จะมี การชักนำให้พืชปิดปากใบเพื่อลดการสูญเสียน้ำและรักษาสมดุลในพืช และยังมีผลต่อการจำกัด CO<sub>2</sub> ของพืช (Hopkins, 1995) ทั้งยังส่งผลให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงลดลงด้วย จากการศึกษาคลอโรฟิลล์ฟลูออเรสเซนซ์ เป็นการวัดอัตราส่วนของ  $F_v/F_m$  ซึ่งแสดงถึงความสามารถของ photosystem II

ในการรับพลังงานจากรังสีดวงอาทิตย์และการถ่ายทอดพลังงานไปสู่ photosystem I ซึ่งอิทธิพลของสภาพแวดล้อมมีผลต่อค่า  $F_v$  และ  $F_m$  ในพืช โดยค่า  $F_v$  มีค่าต่ำเมื่ออยู่ในสภาวะเครียด เช่น ความแห้งแล้ง ส่วนค่า  $F_m$  ลดลงเมื่อความเข้มแสงสูง แต่ไม่เปลี่ยนแปลงโดยอุณหภูมิ ซึ่งอัตราส่วนระหว่าง  $F_v/F_m$  มีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการใช้แสง (Krause and Weis, 1991) ดังนั้นคลอโรฟิลล์ฟลูออเรสเซนซ์สามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกพันธุ์พืชที่ทนทานต่อสภาวะเครียดจากสภาพแวดล้อมได้ (Baker and Rosenqvist, 2004) จากผลการทดลอง พบว่า ค่าประสิทธิภาพการให้แสงของต้นกล้ายางพาราเมื่อวัดในสภาวะปกติ (ควบคุม) มีค่า 0.58-0.63 และเมื่อทำการงดน้ำต้นกล้ายางพาราทุกพันธุ์มีอัตราส่วนระหว่าง  $F_v/F_m$  ลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งช่วงสุดท้ายของการงดน้ำ ค่าประสิทธิภาพการให้แสงลดลงมีค่าอยู่ที่ 0.08 - 0.23 แสดงให้เห็นชัดเจนว่า เมื่อต้นกล้ายางพาราอยู่ในสภาวะขาดน้ำจะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงของต้นกล้ายางพาราลดลง ซึ่งผลจากการศึกษาการตอบสนองทางสรีรวิทยาของต้นกล้ายางพาราทั้ง 6 พันธุ์ สามารถแบ่งกลุ่มต้นกล้ายางพาราได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ทนทานต่อสภาวะขาดน้ำได้ดีที่สุด ประกอบด้วย ยางพาราพันธุ์ RRIM 623 และ RRIT 408 กลุ่มที่ทนทานต่อสภาวะขาดน้ำได้ระดับปานกลาง ประกอบด้วย RRIT 251 และ RRIM 600 ส่วนยางพาราพันธุ์ BPM 24 และ PB 5/51 เป็นกลุ่มที่ไวต่อสภาวะขาดน้ำมากที่สุด Sangsing และ Rattanawong (2012) ได้ทำการเปรียบเทียบความสามารถในการทนแล้งของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 พบว่า RRIM 600 จะปิดปากใบเร็วกว่า RRIT 251 เมื่ออยู่ในสภาวะขาดน้ำส่งผลให้ RRIM 600 มีความทนทานต่อสภาวะขาดน้ำได้ดีกว่าพันธุ์ RRIT 251 เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sittichai และ Sdoodee (2014) ที่ได้ศึกษาการตอบสนองทางสรีรวิทยาต่อสภาวะแล้งในยางพาราทั้ง 2 พันธุ์ ซึ่งปลูกในกระถางภายใต้สภาพโรงเรือน พบว่า ยางพาราพันธุ์ RRIM 600 มีแนวโน้มสามารถทนต่อสภาวะขาดน้ำได้ดีกว่าพันธุ์ RRIT 251 เล็กน้อย โดยจากการศึกษาค่าชักนำการเปิดปากใบ พบว่า ยางพาราพันธุ์ RRIM 600 มีค่าชักนำการเปิดปากใบลดลงอย่างรวดเร็วหลังจาก 8 วันของการงดน้ำ ส่วนค่าชักนำการเปิดปากใบ ของยางพาราพันธุ์ RRIT 251 จะค่อยๆ ลดลง หลังจาก 10 วันของการงดน้ำ แต่ค่าศักย์ของใบในยางพาราพันธุ์ RRIT 251 ลดลงอย่างรวดเร็ว การสังเคราะห์แสงและการคายน้ำของยางพาราทั้ง 2 พันธุ์ มีค่าลดลงในสภาวะขาดน้ำ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ การเปรียบเทียบการตอบสนองทางสรีรวิทยาของยางพารา 5 พันธุ์ ที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์จากประเทศอินเดีย ได้แก่ RRII 414, RRII 417, RRII 422, RRII 429 และ RRII 430 เปรียบเทียบกับยางพาราพันธุ์ RRII 105, RRIM 600 และ Tjir 1 พบว่า RRIM 600 มีการลดลงของอัตราการดูดซับคาร์บอนไดออกไซด์ ( $CO_2$  assimilation rate) น้อยที่สุด รองลงมาได้แก่

RRIT 430 มีค่ากิจกรรมการใช้แสงและการส่งผ่านอิเล็กทรอนิกส์ของกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงค่อนข้างคงที่ (Sumesh *et al.*, 2011)

### 3. ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *NCED3* และปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกของต้นกล้ายางพารา ภายใต้สภาวะขาดน้ำ

การศึกษาการแสดงออกของยีน *NCED3* และปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกภายใต้สภาวะขาดน้ำ ของต้นกล้ายางพารา 3 พันธุ์ ที่มีความแตกต่างกันของระดับการทนแล้ง ได้แก่ ต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIT 408 และ RRIM 623 เป็นพันธุ์ที่ทนทานต่อสภาวะขาดน้ำ และต้นกล้ายางพาราพันธุ์ PB 5/51 เป็นพันธุ์ที่ไวต่อสภาวะขาดน้ำ จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED)* ในยางพารา พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NCED3* เส้นสมบูรณ์ มีขนาด (open reading frame) 1,785 นิวคลีโอไทด์ สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนได้ขนาด 595 กรดอะมิโน และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *HbNCED3* จากกรดอะมิโน โดยการสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี neighborhood joining method เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของยีน *HbNCED3* กับพืชอื่นๆ ในฐานข้อมูล GenBank พบว่า โปรตีน *NCED3* ในยางพารามีสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการคล้ายกับมันสำปะหลังมากที่สุด จากการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *NCED3* ในต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIM 623 มีระดับการแสดงออกของยีน *NCED3* น้อยกว่าพันธุ์ RRIT 408 และ PB 5/51 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิก ในต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIM 623 ที่มีปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกน้อยกว่าต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIT 408 และ PB 5/51 อาจเนื่องจาก ต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIM 623 มีกลไกการทนแล้งแบบ avoidance และมีระบบรากที่ยังเล็ก (Ahmad, 1999) ดังภาพภาคผนวกที่ 1

ในพืชที่มีการตัดต่อยีน *NCED* ซึ่งเป็นยีนในกระบวนการสังเคราะห์กรดแอบไซซิก พบว่า สามารถทำให้พืชทนทานต่อสภาวะแล้งได้ดีขึ้น เช่น arabidopsis ยีน *NCED3* เป็นยีนที่มีการแสดงออกสูงในช่วงการงอต้น การตัดต่อยีนดังกล่าวทำให้ arabidopsis มีการสะสมกรดแอบไซซิกในปริมาณที่สูงขึ้น (Luchi *et al.*, 2001; Wan and Li, 2006) เช่นเดียวกับการตัดต่อยีน *NCED1* ในมะเขือเทศ (Thompson *et al.*, 2000) นอกจากนี้ข้าวโคคาโดที่มีการงอต้นน้ำใบเหี่ยว พบปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกเพิ่มสูงขึ้น 10 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับใบปกติ และมีการแสดงออกของยีน *NCED1* และ *NCED2* สูง แต่ไม่พบการแสดงออกของยีน *NCED3* (Chemys and Zeevaart, 2000) อย่างไรก็ตาม พืชที่อยู่ภายใต้สภาวะขาดน้ำ ก็อาจจะทำให้มีการแสดงออกของยีน *NCED3* น้อยได้ จึงส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์กรดแอบไซซิก ทำให้มีปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกที่น้อยด้วยเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับ

ต้นกล้าอย่างพารากลุ่มที่สามารถทนทานต่อสภาวะขาดน้ำได้ดีที่สุดที่พบปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกน้อยที่สุด จากการศึกษาก่อนการสะสมกรดแอบไซซิกในใบของต้นกล้าอย่างพารา โดยพบว่า ต้นกล้าอย่างพาราพันธุ์ PB 5/51 มีปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกในช่วงแรกของการขาดน้ำ ตั้งแต่วันที่ 1 และมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ในขณะที่ต้นกล้าอย่างพาราพันธุ์ RRIT 408 และ RRIM 623 มีปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกที่ต่ำกว่า โดยมีการเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในวันที่ 7 ของการงดน้ำ

Benesova *et al.* (2012) และ Fenta *et al.* (2012) ได้ทำการศึกษาในข้าวโพดและถั่วเหลืองซึ่งเป็นพันธุ์ที่ไวต่อการขาดน้ำ (drought-sensitive genotypes) พบว่า มีการปิดปากใบอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการขาดน้ำ นอกจากนี้ ในพืชบางชนิด ได้แก่ พืชตระกูลหญ้า (kentucky bluegrass และ bentgrass ) พบว่า พันธุ์ที่ทนทานต่อสภาวะแล้ง จะมีปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกในปริมาณที่น้อยกว่าพันธุ์ที่อ่อนแอต่อสภาวะแล้ง (Wang *et al.*, 2004) เช่นเดียวกับในข้าวสาลี (Innes *et al.*, 1984; Quarrie, 1989), ข้าวโพด (Ilahi and Dorffling, 1982), และข้าวฟ่าง (Durley *et al.*, 1983) อย่างไรก็ตามในพืชบางชนิดมีรายงานว่าพันธุ์ที่มีความสามารถในการทนแล้งได้ดีจะมีปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกที่มากกว่าพันธุ์ที่อ่อนแอต่อสภาวะแล้ง (Henson *et al.*, 1981; Larque-Saavedra and Wain, 1976) นอกจากการสะสมกรดแอบไซซิกในสภาวะขาดน้ำแล้ว ในพืชชนิดเดียวกัน ยังมีการตอบสนองของปากใบต่อกรดแอบไซซิกที่แตกต่างกันอีกด้วยโดยในพันธุ์ที่มีความไวต่อกรดแอบไซซิก จะมีแนวโน้มในการทนทานต่อสภาวะแล้งได้ดีกว่า แม้ว่าจะมีปริมาณกรดแอบไซซิกในปริมาณเพียงเล็กน้อยก็ตาม ซึ่งจะส่งผลทำให้ปากใบปิดเพื่อลดการคายน้ำ (Liu *et al.*, 2006) ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจสอบการตอบสนองของปากใบต่อปริมาณกรดแอบไซซิกที่ความเข้มข้นในระดับต่างๆ ได้แก่ 0, 10, 20, 50 และ 100  $\mu\text{M}$  พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของกรดแอบไซซิกเดียวกัน ต้นกล้าอย่างพาราพันธุ์ RRIM 623 มีการตอบสนองโดยการปิดปากใบที่มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับต้นกล้าอย่างพาราพันธุ์ RRIT 408 และ PB 5/51 อย่างเห็นได้ชัด แสดงให้เห็นว่าต้นกล้าอย่างพาราพันธุ์ RRIM 623 มีความไวต่อกรดแอบไซซิกมากกว่าอย่างพาราพันธุ์อื่นๆ ซึ่งอาจเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ต้นกล้าอย่างพาราพันธุ์ RRIM 623 สามารถรักษาระดับน้ำภายในต้นพืชได้ดีโดยมีค่าปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบสูงที่สุด นอกจากนี้การคายน้ำของพืชยังเกี่ยวข้องกับปริมาณควิตเคิลที่สะสมบริเวณใบ หากมีปริมาณควิตเคิลสูง ก็จะมีการคายระเหยน้ำได้น้อยกว่าพืชที่มีปริมาณควิตเคิลต่ำ (Aharoni *et al.*, 2004) ซึ่งอาจจะเป็นอีกตัวชี้วัดที่จะใช้ในการศึกษาต่อไป

## บทที่ 5

### สรุป

#### ลักษณะสัณฐานวิทยาและการตอบสนองทางสรีรวิทยาของต้นกล้ายางพารา 6 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำ

จากการศึกษาการตอบสนองของลักษณะสัณฐานวิทยาและด้านสรีรวิทยาของต้นกล้ายางพารา ภายใต้สภาวะขาดน้ำ มีการเปลี่ยนแปลงทางลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นกล้ายางพารา 6 พันธุ์ หลังจากการทำการงดน้ำเป็นเวลา 5 วัน โดยเริ่มจะแสดงลักษณะอาการเหี่ยวของใบ ก้านใบ และปลายยอด ซึ่งลักษณะดังกล่าวเกิดขึ้นก่อนกับต้นกล้ายางพาราพันธุ์ PB 5/51, BPM 24, RRIM 600, RRIT 251, RRIT 408, และ RRIM 623 ตามลำดับ และหลังจากทำการให้น้ำแก่ต้นกล้ายางพาราทุกพันธุ์อีกครั้ง (re-watering) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIM 623 มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดถึง 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการตอบสนองทางสรีรวิทยา ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในช่วงก่อนการงดน้ำ 0 - 5 วันแรก มีค่าไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อทำการงดน้ำหลังจาก 7 วัน ปริมาณน้ำสัมพัทธ์มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง และต่ำที่สุดในต้นกล้ายางพาราพันธุ์ PB 5/51 เช่นเดียวกับค่าประสิทธิภาพการใช้แสงที่มีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงช่วงสุดท้ายของการงดน้ำ และในช่วง 1-7 วันแรกของการงดน้ำ ปริมาณคลอโรฟิลล์สัมพัทธ์ค่อนข้างคงที่ และเริ่มลดลง อย่างเห็นได้ชัดในวันที่ 11 ของการงดน้ำ ส่วนปริมาณการร่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ในใบยางพาราเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 1 ของการงดน้ำ โดยต้นกล้ายางพาราพันธุ์ PB 5/51 มีปริมาณการร่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์เพิ่มขึ้นมากที่สุด ซึ่งลักษณะการตอบสนองทางสัณฐานวิทยาและทางสรีรวิทยาดังกล่าว สามารถจำแนกพันธุ์ต้นกล้ายางพาราที่มีศักยภาพในการทนทานต่อสภาวะขาดน้ำ ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ทนทานต่อสภาวะขาดน้ำได้ดีที่สุด ประกอบด้วย ยางพาราพันธุ์ RRIM 623 และ RRIT 408 กลุ่มที่ทนทานต่อสภาวะขาดน้ำได้ระดับปานกลาง ประกอบด้วย RRIT 251 และ RRIM 600 ส่วนยางพาราพันธุ์ BPM 24 และ PB 5/51 เป็นกลุ่มที่ไวต่อสภาวะขาดน้ำมากที่สุด

## การโคลนยีน *NCED3* ในยางพารา

จากการโคลนยีน *NCED3* โดยใช้ cDNA ของยางพารา พบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *HbNCED3* มีความยาวทั้งสิ้น 1,785 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นโปรตีนได้ขนาด 595 กรดอะมิโน เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *HbNCED3* ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากพืชชนิดอื่นๆ ในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *HbNCED3* มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NCED3* ในมันสำปะหลังมากที่สุดถึง 91 เปอร์เซ็นต์ และสูงกว่า 83 เปอร์เซ็นต์

## ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *NCED3* และปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกของต้นกล้ายางพาราภายใต้สภาวะขาดน้ำ

จากการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *NCED3* ในต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIM 623 มีระดับการแสดงออกของยีน *NCED3* น้อยกว่าต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIT 408 และ PB 5/51 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกในสภาวะขาดน้ำ โดยต้นกล้ายางพาราพันธุ์ PB 5/51 มีปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกในช่วงแรกของการขาดน้ำเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และมีปริมาณกรดแอบไซซิกสูงที่สุดในวันที่ 5 ของการงดน้ำ หลังจากนั้นปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกจึงลดปริมาณลงในขณะเดียวกันต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIT 408 และ RRIM 623 มีปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกที่ต่ำกว่า และจากการตรวจสอบการตอบสนองของปากใบต่อปริมาณการสะสมกรดแอบไซซิกที่ความเข้มข้นในระดับต่างๆ ได้แก่ 0, 10, 20, 50 และ 100  $\mu\text{M}$  พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายกรดแอบไซซิกเดียวกัน ต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIM 623 มีการตอบสนองโดยการปิดปากใบที่มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIT 408 และ PB 5/51 อย่างเห็นได้ชัด ส่วนต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIT 408 และ PB 5/51 มีการตอบสนองต่อกรดแอบไซซิกในการปิดปากใบที่ใกล้เคียงกัน

## เอกสารอ้างอิง

- คงเอก ศีริงาม. 2558. ผลของการขาดน้ำต่อการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ ปริมาณรงควัตถุ ปริมาณโพรงเส้น และการเจริญเติบโตของข้าว. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 2: 133-146.
- เฉลิมพล แซมเพชร. 2535. สรีรวิทยาการผลิตพืชไร่. กรุงเทพมหานคร: โอ.เอส.พรีนติ้ง เฮ้าส์.
- นวรรตน์ อุดมประเสริฐ, จันทร์จรี กิจจานนท์, ราเชนทร์ ธิรพร และเอนกนันต์ มาช่วย. 2542. อิทธิพลของสภาวะขาดน้ำในระยะออกช่อดอกตัวผู้ต่อระดับของโพรงเส้นและกรดแอบไซซิก และผลผลิตของข้าวโพด. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตรศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์ 33: 310-316.
- นวลมณี พรหมนิล. 2553. อัตราพันธุกรรมของความทนทานแล้งและร้อนในถั่วเขียว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นิวัติ เรืองพานิช. 2535. วิทยาศาสตร์ทุ่งหญ้า. กรุงเทพมหานคร: คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นิศาชล แจ่มพรมมา, ประสิทธิ์ ใจคิด, พัชริน ส่งศรี, ประสาร สวัสดิ์ชิตัง, ศักดา ดาดวง และ สมปอง ธรรมศิริรักษ์. 2555. การประเมินการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ และระดับมาลาอนไดแอลดีไฮด์ของใบอ้อย 10 พันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำ. วารสารแก่นเกษตร 40: 74-82.
- นุชนาฏ เสือเล็ก, ดวงพร อมรเลิศพิศาล, จิรดา สิงขรรัตน์, ปนัดดา โรจน์พิบูลสถิตย์, สุปรานี กองคำ และรัตนา เตียงทิพย์. 2555. ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดพอลิฟีนอลจากน้ำมันเมล็ดชา. ธรรมชาติ เวชสาร 12: 322-330.
- ปรียานุช ลาขุนทด, ปิยะดา ธีระกุลพิศุทธิ, จิรวัดณ์ สนิทชน และ โจนาลิชา แอล เชียงหลิว. 2558. ผลของการขาดน้ำต่อการเปลี่ยนแปลงสถานะของน้ำในใบข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่โครโมโซม 9 บางส่วนถูกแทนที่ด้วยยีนทนแล้ง. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น 15: 46-55.
- ปรียาภรณ์ ต่อบวงศ์, เสาวณี สาธรรวิริยะพงศ์ และ วิทยา สาธรรวิริยะพงศ์ 2549. ผลของสภาวะความเครียดขาดน้ำต่อสัณฐานวิทยาและการออกดอกของส้มเปลือกอ่อนพันธุ์ฮันนี่. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พูนพิภพ เกษมทรัพย์. 2549. ชีววิทยา 2: สมดุลของน้ำในพืช ธาตุอาหารพืช การสังเคราะห์ด้วยแสง นิเวศสรีรวิทยาของการสังเคราะห์แสง การหายใจและเมแทบอลิซึมของไขมัน การเคลื่อนย้ายสารอาหารในพืช การเจริญเติบโตของพืช การเคลื่อนไหวของพืชและสรีรวิทยา การตอบสนองต่อปัจจัยภายนอก ออกซินควบคุมการเจริญเติบโตและพัฒนา ไซโตไคนินควบคุมการแบ่งเซลล์ จิบเบอเรลลินควบคุมความสูงของพืช เอทิลีนฮอร์โมนที่เป็นแก๊ส Abscisic acid



- สร้อยวิทยาของการควบคุมการออกดอก สร้อยวิทยาการตอบสนองต่อปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม. กรุงเทพมหานคร.
- ยุวดี มานะเกษม. 2553. พันธุ์สารออกฤทธิ์สำคัญ และผลของสารสำคัญในกาวเครือขาว. สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- สถาบันวิจัยยาง. 2560. สถิติยาง. เข้าถึงได้จาก [http://www.rubberthai.com/statistic/stat\\_index.htm](http://www.rubberthai.com/statistic/stat_index.htm) [สืบค้นเมื่อ 23 มีนาคม 2561]
- สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. 2548. สร้อยวิทยาของพืช. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สายัณห์ สดุดี. 2534. สภาวะขาดน้ำในการผลิตพืช. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สายัณห์ สดุดี. 2537. สภาวะขาดน้ำในการผลิตพืช. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สุนทรียังษ์ชัชวาล และ ธาดา ชัยสีหา. 2543. Chlorophyll Fluorescence ของใบมะม่วงภายใต้สภาพน้ำขัง. กรุงเทพมหานคร: สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อัญชลี ใจดี. 2555. คู่มือประกอบสื่อการสอนวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย วิชาชีววิทยา: สำนักงานคณะกรรมการการศึกษาขั้นพื้นฐานและคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- 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 Rosenqvist, E. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany* 55: 1607–1621.
- Blackman, P.G. and Davies, W.J. 1985. Root to shoot communication in maize plants of the effects of soil drying. *Journal of Experimental Botany* 36: 39-48.
- Blum, A. and Sinmena, B. 1995. Isolation and characterization of variant wheat cultivars for ABA sensitivity. *Plant Cell and Environment* 18: 77-83.

- Borel, C., Simonneau, T., This, D. and Tardieu, F. 1997. Stomatal conductance and ABA concentration in the xylem sap of barley lines of contrasting genetic origins. *Journal of Plant Physiology* 24: 607-615.
- Bray, E.A., Shih, T.Y., Moses, M.S., Cohen, A., Imai, R. and Plant, A.L. 1999. Water-deficit induction of a tomato H1 histone requires abscisic acid. *Plant Growth Regulation* 29: 35-46.
- Brunner, I., Herzog, C., Dawes, M.A., Arend, M. and Sperisen, C. 2015. How tree roots respond to drought. *Frontiers in Plant Science* 6: 1-16.
- Cha-um, S., Nhung, N.T.H. and Kirdmanee, C. 2010. Effect of mannitol- and salt-induced iso-osmotic stress on proline accumulation, photosynthetic abilities and growth characters of rice cultivars (*Oryza sativa* L. spp. indica). *Pakistan Journal of Botany* 42: 927-941.
- Chernys, J.T. and Zeevaart, J.A.D. 2000. Characterization of the 9-*cis*epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado. *Plant Physiology* 124: 343-353.
- Durley, R.C., Kannangara, T., Seetharama, N. and Simpson, G.M. 1983. Drought resistance of *sorghum bicolor* (L.) Genotypic differences in the concentrations of free and conjugated abscisic, phaseic and indole-3-acetic acids in leaves of field-grown drought-stressed plants. *Canadian Journal of Plant Science* 63: 131-145.
- Esau, K. 1977. *Anatomy of Seed Plants*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Estrada-Melo, A.C., Ma, C. Reid, M.S. and Jiang, C.Z. 2015. Overexpression of an ABA biosynthesis gene using a stress-inducible promoter enhances drought resistance in petunia. *Horticulture Research* 2: 1-9.
- Henson, I.E., Mahalakshmi, V., Bidinger, F.R. and Alagarswamy, G. 1981. Genotypic variation in pearl millet (*Pennisetum americanum* (L.) Leake), in the ability to accumulate abscisic acid in response to water stress. *Journal of Experimental Botany* 32: 899-910.
- Hopkins, W.G. 1995. *Introduction to Plant Physiology*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Hsiao, T.C. 1973. Plant responses to water stress. *Plant Physiology* 24: 519-570.

- Ilahi, I. and Dorffling, K. 1982. Changes in abscisic acid and proline levels in maize varieties of different drought resistance. *Plant Physiology* 55: 129-135.
- Innes, P., Blackwell, R.D. and Qurrie, S.A. 1984. Some effects of genetic variation in drought induced abscisic acid accumulation on the yield and water use of spring wheat. *Journal of Agricultural Science* 102: 341–351.
- Karpinski, S., Escobar, C., Kapinska, B., Creissen, G. and Mullineaux, P.M. 1997. Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light stress. *Plant Cell* 9: 627-640.
- Khodambashi, M., Shiran, B. and Gharaghanipour, N. 2013. Differential expression of *CA7* and *NCED* genes in common bean genotypes under drought stress. *Journal of Agricultural Science and Technology* 15: 1491-1499.
- Krause, G.H. and Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 42: 313-349.
- Kriedemann, P.E. and Lovey, B.R. 1974. Hormonal mediation of plant responses to environmental stress. 461-465. In Bialeski, R.L. (eds. Ferguson, A.R. and Creswell, M.M.) pp. 461-465. The Royal Society of New Zealand.
- Larque-Saavedra, A. and Wain, R.L. 1976. Studies on plant growth regulation substances  
Abscisic acid as a genetic character related to drought tolerance. *Annals of Applied Biology* 83: 291-297.
- Liu, S., Li, H., Lv, X., Ahammed, G.J., Xiu, X., Zhou, J., Shi, K., Asami, T., Yu, J. and Zhou, Y. 2016. Grafting cucumber onto luffa improves drought tolerance by increasing ABA biosynthesis and sensitivity. *Scientific reports* 6: 1-13.
- Liu, S., Liu, J., Cao, J., Bai, C. and Shi, R. 2006. Stomatal distribution and character analysis of leaf epidermis of jujube under drought stress. *Journal of Anhui Agricultural Science* 34: 1315–1318.
- Luchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M.T., Tabata, S., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. 2001. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase*, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 27: 325-333.

- McCree, K.J. and Richardson, S.G. 1987. Stomatal closure vs. osmotic adjustment: A comparison of stress responses. *Crop Science* 27: 539-543.
- Mohsenzadeh, S., Malboobi, M.A., Razavi, K. and Farrahi, A.S. 2006. Physiological and molecular responses of *Aeluropus lagopoides* to water deficit. *Environmental and Experimental Botany* 56: 314-322.
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K. and Tran, L.S.P. 2014. Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant Science* 5: 1-8.
- Qin, X. and Zeevaart, J.A.D. 1999. The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulation of abscisic acid biosynthesis in water-stress bean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 15354-15361.
- Quarrie, S.A. 1980. Genotypic differences in leaf water potential, abscisic acid and proline concentrations in spring wheat during drought stress. *Journal of Experimental Botany* 46: 383-394.
- Quarrie, S.A. 1981. Genetic variability and heritability of drought induced abscisic acid accumulation in spring wheat. *Plant Cell and Environment* 4: 147-151.
- Quarrie, S.A. 1989. Abscisic acid as a factor in modifying drought resistance. *Environmental stress in plants: Biochemical and physiological mechanism*. Germany Springer-Verlag.
- Quarrie, S.A. and Jones, H.G. 1979. Genotypic variation in leaf water potential, stomatal conductance and abscisic acid concentration in spring wheat subjected to artificial drought stress. *Annals of Botany Plants* 44: 323-332.
- Radin, J.W. and Hendrix, D.L. 1988. The apoplastic pool of abscisic acid in cotton leaves in relation to stomatal closure. *Planta* 174: 180-186.
- Salisbury, F.B. and Ross, C.W. 1978. *Plant Physiology*. California.
- Salisbury, F.B. and Ross, C.W. 1992. *Plant Physiology*. California.
- Samet, J.S., Sinclair, T.R. and Cortes, P.M. 1980. ABA in leaves of field-grown soybean under water stress. In *Genetic engineering of osmoregulation*. (eds. Rains, D.W., Valentine, R.C. and Hollaender, A.). pp. 366-389. New York.

- Sangsing, S. and Rattanawong, R. 2012. Hydraulic traits quantification for drought tolerance consideration in *Hevea brasiliensis*: obtaining data and two clones performance. Rubber Thai Journal 1: 56-61.
- Sapeta, H., Costa, J.M., Lourenc, T., Maroco, J., Linde, P. and Oliveira, M.M. 2013. Drought stress response in *Jatropha curcas*: Growth and physiology. Environmental and Experimental Botany 85: 76–84.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 1997. Gene expression and signal transduction in water stress response. Plant Physiology 115: 327-334.
- Sittichai, S. and Sdoodee, S. 2013. Difference in physiological responses to water stress between two rubbers (*Hevea brasiliensis*) clones of RRIM 600 and RRIT 251. International Journal of Agricultural Technology 9: 743-754.
- Sumesh, K.V., Satheesh, P.R., Annamalainathan, K., Krishnakumar, R., Thomas, M. and Jacob, J. 2011. Physiological evaluation of a few modern *Hevea brasiliensis* clones for intrinsic drought tolerance. Natural Rubber Research 24: 61-67.
- Sung, F.J.M. and Krieg, D.R. 1979. Relative sensitivity of photosynthetic assimilation and translocation of carbon to water stress. Plant Physiology 64: 852-856.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 1991. Plant Physiology. Redwood City: The Benjamin Cummings Publishing Company.
- Thompson, A.J., Jackson, A.C., Symonds, R.C., Mulholland, B.J., Dadswell, A.R., Bllake, P.S., Burbidge, A. and Taylor, I. B. 2000. Ectopic expression of a tomato *9-cis- epoxycarotenoid dioxygenase* gene causes over-production of abscisic acid. The Plant Journal 23: 363-374.
- Turner, N.C. and Jones, M.M. 1980. Turgor maintenance by osmotic adjustment. In A review and evaluation. (eds. Turner, N.C. and Kramer, P.J.) pp. 87-103. New York: Wiley.
- Turyagyenda, L.F., Kizito, E.B., Ferguson, M., Baguma, Y., Agaba, M., Harvey, J.J.W. and Osiru, D.S.O. 2013. Physiological and molecular characterization of drought responses and identification of candidate tolerance genes in cassava. Journal of Experimental Botany 5: 1-17.

- Venkatachalam, L., Thanessm, L. and Thulaseedharan, A. 1999. A rapid and efficient method for isolation of RNA from bark tissue of *Hevea brasiliensis*. *Current Science* 77: 635-637.
- Wan, X.R. and Li, L. 2006. Regulation of ABA level and water-stress tolerance of *Arabidopsis* by ectopic expression of a peanut *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase* gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 347: 1030-1038.
- Wang, L., Wang, M. and Zhang, Y. 2014. Effects of powdery mildew infection on chloroplast and mitochondrial functions in rubber tree. *Tropical Plant Pathology* 39: 243-249.
- Wang, Li. F. 2014. Physiological and molecular responses to drought stress in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *Plant Physiology and Biochemistry* 83: 243-249.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O. and Altman, A. 2001. Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations. *Acta Horticulturae* 560: 285-292.
- Wang, Z. and Huang, B. 2003. Genotypic Variation in Abscisic Acid Accumulation, Water Relations, and Gas Exchange for Kentucky Bluegrass Exposed to Drought Stress. *HortScience* 128: 349-355.
- Wang, Z., Huang, B., Bonos, S.A. and Meyer, W.A. 2004. Abscisic Acid Accumulation in Relation to Drought Tolerance in Kentucky Bluegrass. *HortScience* 39: 1133-1137.
- Xiong, L. and Zhu, J.K. 2003. Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiology* 133: 29-36.
- Zhang, C., Zhang, L., Zhang, S., Zhu, S., Wu, P., Chen, Y., Li, M., Jiang, H. and Wu, G. 2015. Global analysis of gene expression profiles in physic nut (*Jatropha curcas* L.) Seedlings exposed to drought stress. *BioMed Central Plant Biology* 15: 1-14.
- Zhang, J. and Davies, W.J. 1987. ABA in roots and leaves of flooded pea plants. *Journal of Experimental Botany* 38: 649-659.

- Zhao, P., Liu, P., Shao, J., Li, C., Wang, B., Guo, X., Yan, B., Xia, Y. and Peng, M. 2015. Analysis of different strategies adapted by two cassava cultivars in response to drought stress: ensuring survival or continuing growth. *Journal of Experimental Botany* 66: 1477-1488.
- Zingaretti, S.M., Inácio, M.C., Pereira, L.M., Paz, T.A. and França, S.C. 2013. Water stress and agriculture. *Intech* 151-179.

ภาคผนวก



## ภาคผนวก

### การเตรียมสารสำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอ

1) Extraction buffer สำหรับสกัดอาร์เอ็นเอปริมาตร 100 มิลลิลิตร

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

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

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

น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
DEPC	1	มิลลิลิตร

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

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

Chloroform	96	มิลลิลิตร
Isoamyl alcohol	2	มิลลิลิตร

4) 8 M LiCl ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

LiCl	16.952	กรัม
น้ำกลั่น		

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

## 5) 2 M LiCl ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

LiCl	4.238	กรัม
น้ำกลั่น		

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

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

Sodium acetate	40.238	กรัม
น้ำกลั่น		

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

**การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ**

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

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

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

## 2) Luria Bertani broth ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

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

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

### การเตรียมสารสำหรับการเตรียม Competent cell (Sambrook and Russell, 2001)

1) 0.1 M Calcium chloride ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

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

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

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

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

ผสมสารทั้งหมดให้เป็นเนื้อเดียวกัน และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที

### การเตรียมสารที่ใช้ในการทำ Agarose gel electrophoresis

1) TAE buffer ความเข้มข้น 50 เท่า ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

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

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

2) TBE buffer

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

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

#### การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการสกัดกรดแอบไซซิก (ดัดแปลงจาก Walker-Simmons *et al.*, 2000)

1) 100 % methanol extracting ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

0.5 g/L Citric acid	0.5	กรัม
100 mg/L BHT	0.1	กรัม
100% methanol	1,000	มิลลิลิตร

ละลายสารให้เข้ากัน และปรับปริมาตรด้วย 100% methanol ให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในที่มืด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2) 70 % methanol ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Methanol	700	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3) 62.5 % methanol ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Methanol	625	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	375	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดแอบไซซิกทั้งหมด (Phytodetek<sup>®</sup> ABA Test kit)

1) Substrate Diluent ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Magnesium chloride	0.1	กรัม
Sodium azide	0.2	กรัม
Diethanolamine	97	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน พร้อมปรับ pH ให้เท่ากับ pH 9.8 ด้วย hydrochloric acid หลังจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## 2) TBS buffer (1X) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Trizma base	0.53	กรัม
Trizma hydrochloride	3.25	กรัม
Sodium chloride	5.84	กรัม
Magnesium chloride hexahydrate	0.2	กรัม
Sodium azide	0.2	กรัม

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน พร้อมปรับ pH ให้เท่ากับ pH 7.5 หลังจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## 3) PBST buffer (Wash buffer) (1X) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Sodium chloride	8	กรัม
Sodium phosphate, dibasic (anhydrous)	1.15	กรัม
Potassium phosphate, monobasic (anhydrous)	0.2	กรัม
Potassium chloride	0.2	กรัม
Tween-20	0.5	กรัม
Sodium azide	0.2	กรัม

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน พร้อมปรับ pH ให้เท่ากับ pH 7.4

**การเตรียมสารสำหรับใช้ในการทดสอบความไวต่อกรดแอบไซซิกในใบยางพารา**

## 1) Buffer (10 mM KCl, 7.5 mM iminodiacetic acid และ 10 mM MES) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

10 mM KCl	0.7455	กรัม
7.5 mM iminodiacetic acid	0.9983	กรัม
10 mM MES	1.9524	กรัม

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน พร้อมปรับ pH ให้เท่ากับ pH 6.2 ด้วย KOH หลังจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

2) Abscisic Acid (ABA) ความเข้มข้น 100  $\mu$ M ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Abscisic Acid (ABA)	0.026432	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

3) Abscisic Acid (ABA) ความเข้มข้น 50  $\mu\text{M}$  จาก Stock 100  $\mu\text{M}$  ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Abscisic Acid (ABA)	500	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

4) Abscisic Acid (ABA) ความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  จาก Stock 50  $\mu\text{M}$  ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

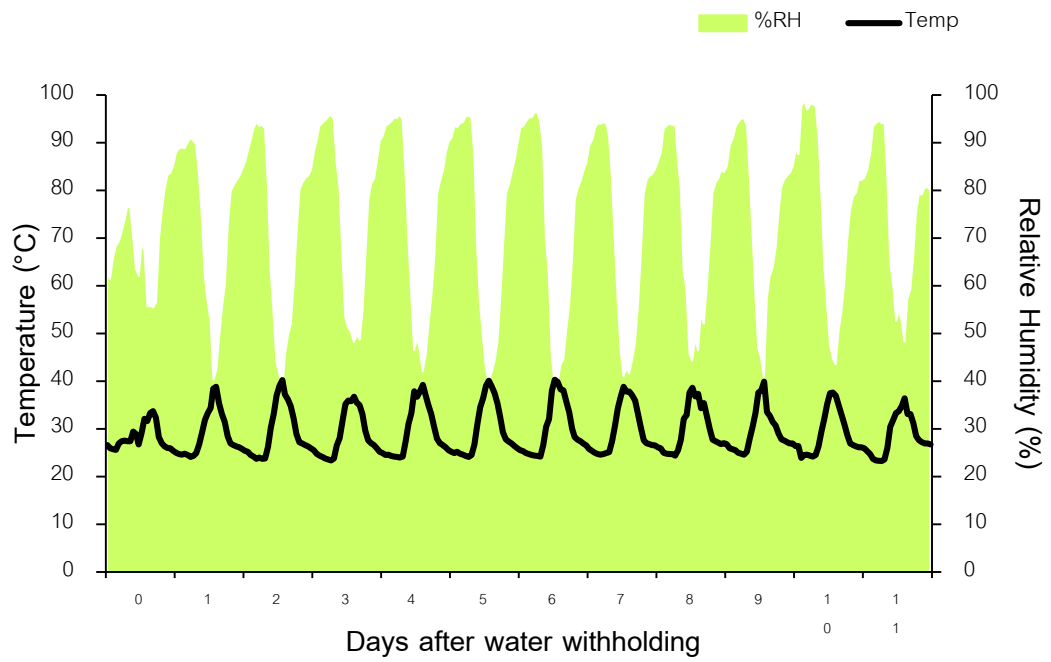
Abscisic Acid (ABA)	400	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	600	มิลลิลิตร

5) Abscisic Acid (ABA) ความเข้มข้น 10  $\mu\text{M}$  จาก Stock 20  $\mu\text{M}$  ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Abscisic Acid (ABA)	500	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร



ภาพภาคผนวกที่ 1 ระบบรากแบบหยั่งลึกของยางพารา 3 พันธุ์ ได้แก่ PB 5/51, RRIM 623 และ RRIT 408 ภายใต้การให้น้ำปกติและภายใต้สภาวะขาดน้ำ



ภาพภาคผนวกที่ 2 การศึกษาอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ภายใต้สภาวะโรงเรือน ตลอดการทดลอง ตั้งแต่วันที่งดน้ำ 0-11 วัน ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ ปี พ.ศ.2561

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวชุตติมา สุทจิตร  
 รหัสประจำตัวนักศึกษา 5810620036  
 วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2558

## ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

1. ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ ปีงบประมาณ 2560 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2. ทุนสนับสนุนจากสถานวิจัยความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร และทรัพยากรธรรมชาติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
3. ทุนสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิต และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ