



การแสดงออกของยีนในกลุ่ม Phenylpropanoid ต่อความเข้ากันได้ของ
ต้นตออย่างพาราและกิ่งพันธุ์ดี

**Expression Profile of Phenylpropanoid Related Genes on Compatibility of
Rubber Tree Rootstock-scion**

อุไรพร ปราบปรี

Auraiporn Prabpree

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต 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

2563

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การแสดงออกของยีนในกลุ่ม Phenylpropanoid ต่อความเข้ากันได้ของต้น
ตอยางพาราและกิ่งพันธุ์ดี

ผู้เขียน นางสาวอุไรพร ปราบปรี

สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กรกช นาคคณอง)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สายัณห์ สดุดี)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กรกช นาคคณอง)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.จรัสศรี นวลศรี)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.จรัสศรี นวลศรี)

.....

(ดร.ณัฐภากร วรอัฐสิน)

.....กรรมการ

(ดร.ณัฐภากร วรอัฐสิน)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ระวี เจียรวิภา)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับ
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งแสง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคล
ที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กรกช นาคคณง)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นางสาวอุไรพร ปราบปรี)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน
และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวอุไรพร ปราบปรี)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การแสดงออกของยีนในกลุ่ม Phenylpropanoid ต่อความเข้ากันได้ของ ต้นตออย่างพาราและกิ่งพันธุ์ดี
ผู้เขียน	นางสาวอุไรพร ปราบปรี
สาขาวิชา	พืชศาสตร์
ปีการศึกษา	2562

บทคัดย่อ

ยางพาราเป็นพืชที่นิยมขยายพันธุ์โดยวิธีการติดตา ซึ่งบางครั้งความสามารถของการเข้ากันได้ระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี อาจส่งผลกระทบต่อเจริญเติบโต และผลผลิตของยางพารา ดังนั้นการศึกษาดังนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของกลไกการเข้ากันได้ ในยางพารา ระหว่างการติดกิ่งพันธุ์ดีบนต้นตอพันธุ์เดียวกัน (homograft) และการติดกิ่งพันธุ์ดีบนต้นตอต่างพันธุ์ (heterograft) โดยประเมินจากการแสดงออกของยีน และกิจกรรมของเอนไซม์ รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของสารเมตาบอไลต์ในกลุ่ม phenylpropanoid และการศึกษาลักษณะทางกายวิภาค หลังการติดตายางพาราพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 ที่ติดตากับต้นตอ PB 5/51 ซึ่งเป็นการติดตาแบบ heterografts (RRIM 600 / PB 5/51 และ RRIT 251 / PB 5/51) เปรียบเทียบกับการติดตาแบบ homografts (RRIM 600 / RRIM 600 และ RRIT 251 / RRIT 251) อายุ 0 3 5 7 10 และ 20 วัน หลังการติดตา ผลการทดลองพบว่า การติดตาแบบ homografts มีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จของการติดตา และการเจริญเติบโตดีกว่าการติดตาแบบ heterograft ยกเว้นการติดตายางพาราพันธุ์ RRIM 600 / RRIM 600 ในขณะที่พัฒนาการของรอยเชื่อมประสานเริ่มจากการเพิ่มปริมาณแคลลัสจนเต็มช่องว่างในระยะ 10 วันหลังการติดตา ซึ่งการติดตายางพาราพันธุ์ RRIT 251 / RRIT 251 และ RRIM 600 / PB 5/51 เนื้อเยื่อแคลลัสสามารถพัฒนาไปเป็นท่อน้ำใหม่ได้รวดเร็วว่าการติดตาของ RRIM 600 / RRIM 600 และ RRIT 251 / PB 5/51 ดังนั้นจึงสามารถจำแนกการเข้ากันได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่สามารถเข้ากันได้ดี (compatible combinations) และกลุ่มที่สามารถเข้ากันได้ไม่ดี (less compatible combinations) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วที่อายุ 5 วันหลังการติดตา หลังจากนั้นการสะสมของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดค่อนข้างคงที่ สำหรับระดับการแสดงออกของยีน *HbPAL* จะเพิ่มสูงขึ้นมากที่สุดในวันที่ 3 หลังการติดตา และจะลดระดับการแสดงออกของยีนลง สอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ PAL โดยพบว่า 3 วันหลังการติดตามีกิจกรรมของเอนไซม์ PAL สูงที่สุด และมีแนวโน้มลดลงในช่วง 5-10 วันหลังการติดตา นอกจากนี้ปริมาณลิคินินยังสอดคล้องกับระดับการแสดงออกของยีน *HbCAD* โดยการสะสมปริมาณลิคินิน

เพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 10 หลังการติดเชื้อ และการแสดงออกของยีน *HbCAD* จะมีระดับเพิ่มสูงขึ้นที่ 7 วันหลังการติดเชื้อ โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ระดับการแสดงออกของยีน *HbPAL* และกิจกรรมของเอนไซม์ PAL ในกลุ่ม less compatible combinations จะมีระดับที่สูงกว่าการติดเชื้อในกลุ่ม compatible combinations ตรงข้ามกับการสะสมปริมาณลิกนิน และการแสดงออกของยีน *HbCAD* ที่พบในการติดเชื้อกลุ่ม compatible combinations สูงกว่าการติดเชื้อในกลุ่ม less compatible combinations โดยการศึกษาครั้งนี้ พบว่า การสะสมของสารลิกนิน และการแสดงออกของยีน *HbCAD* หลังการติดเชื้อ สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดสำหรับทำนายความสามารถในการเข้ากันได้ระหว่างต้นตอของพารา และกิ่งพันธุ์ได้

Thesis Title	Expression Profile of Phenylpropanoid Related Genes on Compatibility of Rubber Tree Rootstock-scion
Author	Miss Auraiporn Prabpree
Major Program	Plant Science
Academic Year	2019

Abstract

Rubber tree is propagated by bud grafting. However, graft combinations may affect to growth and yield of the scion. The objective of this studied was to investigate the relations of graft combinations mechanism of rubber rootstocks and scions between homograft and heterograft. RRIM 600 and RRIT 251 were used as scion bud grafted onto PB 5/51 for heterograft (RRIM 600 / PB 5/51 and RRIT 251 / PB 5/51) or itself for homografts (RRIM 600 / RRIM 600 and RRIT 251 / RRIT 251). After bud grafting, gene expression, enzyme activity, secondary metabolite in the phenylpropanoid pathway and graft union formation were investigated. The result showed that homograft gave a higher survival rate and growth rate of scion than heterograft except for RRIM 600 bud grafted onto RRIM 600 rootstock. Initial graft union formation promoted filling of spaces by callus tissue until full spaces area at 10 days after bud grafting. RRIT 251 / RRIT 251 and RRIM 600 / PB 5/51 had callus tissue which develop better than RRIM 600 / RRIM 600 and RRIT 251 / PB 5/51. This study can separate graft combination into 2 groups including compatible and less compatible combinations. Phenolic compounds rapidly increased at 5 days after bud grafting and became stable. For *HbPAL* gene expression in grafted plants rapidly increased at 3 days after bud grafting before declining and remained relatively unchanged during the latter stage. Accordance with PAL enzyme activity, which was highest increased at 3 days after bud grafting and subsequently decreased during 5-10 days after bud grafting. In addition, lignin accumulation was consistent with the level of *HbCAD* gene expression. Lignin content was highest increased at 10 days after bud grafting. *HbCAD* transcription level exhibited highest at 7 days after bud grafting. Higher phenolic compound content, *HbPAL* gene expression and PAL enzyme activity were found in less compatible group than compatible group. In contrast, lignin content and *HbCAD* gene expression was found higher

in the compatible combinations than less compatible combinations. This study found that lignin content and *HbCAD* gene expression can be used as indicators for predict graft compatible ability between rubber rootstocks and scions.

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กรกช นาคคณอง อาจารย์ที่ปรึกษาหลักในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นอย่างสูง ที่คอยให้คำแนะนำ ชี้แนะแนวทางในการทำงาน และการค้นคว้าข้อมูลเพิ่มเติม คอยแก้ไขปัญหาต่างๆ และตรวจทานแก้ไขความถูกต้องของการเขียนวิทยานิพนธ์ รวมถึงให้ความช่วยเหลือตลอดการทำงานวิจัยจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.จรัสศรี นวลศรี และดร.ณัฐภากร วรอัฐสิน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำในการวิจัย และตรวจแก้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ระวี เจียรวิภา กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำในการวิจัย และคอยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และรองศาสตราจารย์ ดร.สายัณห์ สดุดี กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งให้เกียรติเป็นประธานในการสอบ และตรวจแก้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณทุนสนับสนุนจากหน่วยงานต่างๆ ประกอบด้วย ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ สถาบันวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 2 คณะทรัพยากรธรรมชาติ และสถาบันวิจัยและพัฒนานวัตกรรมยางพารา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับความอนุเคราะห์เงินทุน และวัสดุอุปกรณ์ต่างๆ สำหรับการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณชัยพร วรธรรมาโส ศูนย์วิจัยยางสงขลาสำหรับความอนุเคราะห์ในการติดตามยางพาราจนสามารถทำงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบคุณนางสาวรสริน ช่วยการ สำหรับความช่วยเหลือในการเก็บเมล็ดพันธุ์ยางพารา จนมีจำนวนเมล็ดเพียงพอต่อการทำงานวิจัย นายณัฐพงษ์ ยังสกุล และนายทรงวุฒิ เต็งรัง สำหรับความช่วยเหลือในการติดตั้งระบบน้ำให้กับต้นยางพาราในแปลงปลูก และคอยอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ นางสาวอรรธรรณ แก้วรักษา นายฐนิชกรณ์ รองสวัสดิ์ สำหรับความช่วยเหลือ และให้คำปรึกษา รวมทั้งแนะนำการเขียนวิทยานิพนธ์จนงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จโดยสมบูรณ์ สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัวปราบปรี พี่ๆ น้องๆ ตลอดจนผู้ที่มีพระคุณทุกท่าน ที่ให้การสนับสนุนช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน ทั้งคอยให้คำแนะนำ ให้กำลังใจ ผลักดัน และคอยเป็นที่ปรึกษามาโดยตลอดจนสำเร็จการศึกษา

อุไรพร ปราบปรี

สารบัญ

สารบัญ	หน้า
รายการตาราง	(11)
รายการภาพประกอบ	(12)
รายการตารางภาคผนวก	(14)
รายการภาพภาคผนวก	(15)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำตั้งเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	16
2. วิธีการวิจัย	17
วัสดุและอุปกรณ์	17
วิธีดำเนินการ	24
3. ผล	30
4. บทวิจารณ์	48
5. บทสรุป	58
เอกสารอ้างอิง	59
ภาคผนวก	66
ประวัติผู้เขียน	79

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. พันธุ์ยางพารา และสถานที่เก็บเมล็ดพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง	17
2. เปอร์เซ็นต์ของลิกนินในสารละลายประกอบฟีนอลิกทั้งหมด หลังการติด ตา 0 3 5 7 10 และ 20 วัน	43

รายการภาพประกอบ

ภาพที่	หน้า
1. ขั้นตอนการเชื่อมประสานกันระหว่างต้นต่อ และกิ่งพันธุ์ดี	6
2. การวางแผนตาในขนาดแผลของต้นต่อและเกิดการเชื่อมประสานของรอยต่อ รูปถ่าย เป็นรูปหน้าตัดของการติดตาแบบ Chip budding และ T-budding	8
3. การจำแนกกลุ่มของสารประกอบฟีโนลิกทั้งหมดในวิธี phenylpropanoid	12
4. วิธี phenylpropanoid	14
5. เปอร์เซ็นต์ความสำเร็จของการติดตาที่อายุ 30 วันภายหลังการติดตา	30
6. เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของกิ่งพันธุ์ภายหลังการติดตาแบบ homograft: RRIT 251 / RRIT251 (A) และ RRIM 600 / RRIM 600 (B) และการติดตาแบบ heterograft: RRIT 251 / PB 5/51 (C) และ RRIM 600 / PB5/51(D) ในสภาพ โรงเรือน ที่อายุ 60 วันหลังการติดตา	31
7. เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของกิ่งพันธุ์ภายหลังการติดตาแบบ homograft: RRIT 251 / RRIT251 (A) และ RRIM 600 / RRIM 600 (B) และการติดตาแบบ heterograft: RRIT 251 / PB 5/51 (C) และ RRIM 600 / PB5/51(D) ในสภาพ แปลงปลูก ที่อายุ 230 วันหลังการติดตา	32
8. ความยาวของยอดที่แตกใหม่ภายหลังการติดตาขางพาราพันธุ์ RRIT 251 และ RRIM 600 บนต้นต่อพันธุ์ต่างๆ ที่อายุ 0 – 230 วัน	33
9. ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของยอดที่แตกใหม่ภายหลังการติดตาขางพาราพันธุ์ RRIT 251 และ RRIM 600 บนต้นต่อพันธุ์ต่างๆ ที่อายุ 0 – 230 วัน	33
10. จำนวนใบของยอดที่แตกใหม่ภายหลังการติดตาขางพาราพันธุ์ RRIT 251 และ RRIM 600 บนต้นต่อพันธุ์ต่างๆ ที่อายุ 0 – 230 วัน	34
11. พัฒนาการของรอยต่อระหว่างต้นต่อพันธุ์ RRIT 251 และกิ่งพันธุ์ RRIT 251 ภายหลังการติดตาที่อายุ 5 (ก), 10 (ข) และ 20 (ค) วัน โดยภาพคอลัมน์ทางขวา เป็นภาพขยายในกรอบสีแดงของรูปซ้ายมือ และ R: Rootstock, SC: Scion, ca: callus, nx: new xylem, cb: callus bridge	36

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
12. พัฒนาการของรอยต่อระหว่างต้นตอพันธุ์ RRIM 600 และกิ่งพันธุ์ RRIM 600 ภายหลังจากติดตาที่อายุ 5 (ก), 10 (ข) และ 20 (ค) วัน โดยภาพคอลัมน์ทางขวาเป็นภาพขยายในกรอบสีแดงของรูปซ้ายมือ และ R: Rootstock, SC: Scion, ca: callus, nx: new xylem, cb: callus bridge	37
13. การพัฒนาของรอยต่อระหว่างต้นตอพันธุ์ PB 5/51 และกิ่งพันธุ์ RRIT 251 ภายหลังจากติดตาที่อายุ 5 (ก), 10 (ข) และ 20 (ค) วัน โดยภาพคอลัมน์ทางขวาเป็นภาพขยายในกรอบสีแดงของรูปซ้ายมือ และ R: Rootstock, SC: Scion, ca: callus, nx: new xylem, cb: callus bridge	38
14. พัฒนาการของรอยต่อระหว่างต้นตอพันธุ์ PB 5/51 และกิ่งพันธุ์ RRIM 600 ภายหลังจากติดตาที่อายุ 5 (ก), 10 (ข) และ 20 (ค) วัน โดยภาพคอลัมน์ทางขวาเป็นภาพขยายในกรอบสีแดงของรูปซ้ายมือ และ R: Rootstock, SC: Scion, ca: callus, nx: new xylem, cb: callus bridge	39
15. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในยางพารา ภายหลังจากติดตาที่ระยะ 0 3 5 7 10 และ 20 วัน	41
16. การสะสมของปริมาณลิกนินของยางพาราที่ 0 3 5 7 10 และ 20 วันภายหลังจากติดตา	42
17. กิจกรรมของเอนไซม์ PAL ในยางพาราภายหลังจากติดตาที่ระยะ 0 3 5 7 10 และ 20 วัน	44
18. ระดับการแสดงออกของยีน <i>HbPAL</i> ในยางพาราภายหลังจากติดตาที่ระยะ 0 3 5 7 10 และ 20 วัน	46
19. ระดับการแสดงออกของยีน <i>HbCAD</i> ในยางพาราภายหลังจากติดตาที่ระยะ 0 3 5 7 10 และ 20 วัน	47

รายการตารางภาคผนวก

ตารางที่	หน้า
1. สูตรน้ำยาดังน้ำออกจากเซลล์พืช 12 ลำดับ	67
2. ขั้นตอนการเตรียมชิ้นส่วนพืชจนเป็นบล็อกพาราฟิน	69
3. ขั้นตอนการย้อมสีเนื้อเยื่อพืช	70

รายการภาพภาคผนวก

ภาพที่	หน้า
1. กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิกสำหรับคำนวณ ปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	71
2. กราฟมาตรฐานของสารละลาย lignin, alkali สำหรับคำนวณปริมาณลิกนิน	73
3. กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐานสำหรับคำนวณปริมาณ โปรตีน	75
4. กราฟมาตรฐานของสารละลาย tran-cinnomic acid สำหรับคำนวณกิจกรรม ของเอนไซม์ PAL	76

บทที่ 1

บทนำ

1. บทนำต้นเรื่อง

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจหลักของประเทศไทย ซึ่งมีการปลูกอย่างแพร่หลายทั่วประเทศ มีผลต่อเศรษฐกิจ และชีวิตความเป็นอยู่ของประชากรไทยเป็นอย่างมาก โดยปัจจุบันประเทศไทยมีเนื้อที่ขึ้นต้นของยางพาราทั้งหมด 22,531,000 ไร่ และให้ผลผลิตสูงประมาณ 4,840,000 ตันต่อปี (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2562) แต่เนื่องจากประเทศไทยโดยเฉพาะพื้นที่ภาคใต้มีสภาพอากาศแบบร้อนชื้น มีปริมาณฝนมาก ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราที่เป็นสาเหตุหลักในการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคใบจุดก้ำปลา โรคเส้นดำ โรคเปลือกเน่า และโรครากขาว เป็นต้น เมื่อมีการระบาดของโรครากขาว เชื้อสาเหตุจะเข้าทำลายยางพารา และไม่มีวิธีการกำจัด ทำให้ยางพาราขึ้นต้นตาย ส่งผลให้ผลผลิตเสียหายเป็นอย่างมาก (Nandris *et al.*, 1998 อ้างโดย สายทอง, 2556) จึงมีการศึกษาพันธุ์ยางพาราดั้งเดิมที่มีความทนทานต่อโรครากขาว เพื่อนำมาเป็นต้นตอ แต่ต้นตอนั้นต้องผ่านการทดสอบความเข้ากันได้เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโต และผลผลิตของกิ่งพันธุ์ดี จากการทดลองของ จรัสศรี และคณะ (2559) ซึ่งให้เห็นว่า ยางพาราพันธุ์ PB 5/51 มีศักยภาพที่จะนำมาใช้เป็นต้นตอที่ทนทานต่อโรครากขาวได้ เนื่องจากมีการแสดงออกของกลุ่มยีน *PRs* สูงหลังการปลูกถ่ายเชื้อโรครากขาว ทั้งนี้การคัดเลือกต้นตอยางพาราที่มีการเจริญเติบโตที่ดี และมีศักยภาพในการต้านทานโรครากขาวแล้ว ยังพบว่ายางพาราที่ใช้ในการผลิตต้นตอแต่ละพันธุ์มีความสามารถในการเข้ากันได้กับกิ่งพันธุ์ดีแตกต่างกันด้วย ซึ่งจะส่งผลต่อการให้ผลผลิตน้ำยางของยางพารา โดยจากการศึกษาของ Goncalves และ Martins (2002) ที่ได้ทำการประเมินผลผลิตและการเจริญเติบโตของยางพารา เพื่อตรวจหาต้นตอที่มีความสามารถในการเข้ากันได้แบบทั่วไป (general combining ability) และความสามารถในการเข้ากันได้แบบจำเพาะ (specific combining ability) โดยใช้ต้นตอ และกิ่งพันธุ์ IAN 873, RRIM 600, RRIM 701, PB 235 และ GT 1 ผลการทดลองพบว่า กิ่งพันธุ์ RRIM 600 เป็นพันธุ์ที่มีความสามารถในการเข้ากันได้ดีกับต้นตอหลายพันธุ์ เนื่องจากให้ค่าความสามารถในการเข้ากันได้แบบทั่วไปที่ดีที่สุด แต่มีค่าความสามารถในการเข้ากันได้แบบจำเพาะน้อยกว่าพันธุ์อื่นๆ

สุวีรัตน์ และเมืองทอง (2532) กล่าวว่า การขยายพันธุ์พืชโดยการให้เนื้อเยื่อของพืชสองชิ้นเชื่อมต่อกันจะยึดเอาหลักความใกล้ชิดของกลุ่มพืชทางพฤกษศาสตร์เป็นสำคัญ พืชที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมจะสามารถเข้ากันได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับ Donald (1973) ที่ศึกษาความสัมพันธ์

และการเข้ากันได้ของการประสานและไม่ประสานกันระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีในพืชตระกูลสน พบว่าประมาณ 75% ของการเข้ากันได้ระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์เกิดจากพันธุกรรมประมาณ 50% ในกรณีต้นตอ และกิ่งพันธุ์ไม่มีความสัมพันธ์กันทางพันธุกรรมนั้น พบว่าสามารถเข้ากันได้ประมาณ 56% ซึ่งความเข้ากันไม่ได้ อาจเกิดจากการถ่ายทอดสารบางอย่างที่เป็นพิษจากฝ่ายหนึ่งไปยังอีกฝ่าย ทำให้ท่ออาหารเสียหายเกิดรอยสีน้ำตาล เนื่องจากการสะสมสารฟีนอลิกที่เป็นพิษในบริเวณรอยต่อระหว่างต้นตอกับกิ่งพันธุ์ดี (นันทิยา, 2542) อีกทั้งพืชจะกระตุ้นการสร้างสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้นเมื่อลำต้นเกิดบาดแผล ดังนั้น หากพบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในบริเวณที่ติดตามาก จะส่งผลให้เกิดความไม่เข้ากันของเนื้อเยื่อ (Errea, 1998) ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกจะถูกสังเคราะห์โดยยีน *Phenylalanine Ammonia Lyase (PAL)* เป็นยีนตัวแรกใน phenylpropanoid pathway หากมีการแสดงออกของยีนดังกล่าวต่ำ จะทำให้เนื้อเยื่อสามารถเข้ากันได้ดี (Pina and Errea, 2008) นอกจากนี้ Chabannes และคณะ (2001) กล่าวว่า ลิกนินเป็นองค์ประกอบหลักของไม้เนื้อแข็ง และเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์ ทำให้ลำต้นมีความแข็งแรง เนื่องจากว่า ลิกนินมีผลต่อกระบวนการในการรักษาบาดแผล และการสร้างแคลลัส รวมถึงการเชื่อมต่อของท่อน้ำ และท่ออาหารในพืชอีกด้วย จึงสามารถลำเลียงน้ำ และสารละลายผ่านระบบท่อลำเลียงได้ กุหลาบ และประสาน (2548) ได้ศึกษากระบวนการสังเคราะห์สารลิกนิน พบว่าการสังเคราะห์สารลิกนินเกิดขึ้นในกระบวนการ phenylpropanoid pathway ซึ่งสังเคราะห์จาก phenylalanine ไปเป็น ligninmonomer โดยยีน *Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase (CAD)* ซึ่งถ้ายีนดังกล่าวมีการแสดงออกอย่างเต็มที่ จะทำให้ได้ลิกนินที่มีคุณภาพสูง ดังนั้นการศึกษาการแสดงออกของยีน *PAL* และยีน *CAD* ภายหลังการติดตา และปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก และลิกนินภายหลังการติดตา อาจจะเป็นตัวชี้วัดที่สามารถใช้เป็นแนวทางในการประเมินความเข้ากันได้ของต้นตออย่างพารา และกิ่งพันธุ์ดี

2. ตรวจสอบเอกสาร

2.1 ข้อมูลยางพารา

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สร้างรายได้ให้กับประเทศไทยเป็นอย่างมาก ปัจจุบันประเทศไทยนับได้ว่าเป็นประเทศที่มีผลผลิตยางพารามากที่สุดในโลก คือปีละ 2.5 ล้านตัน ซึ่งคิดเป็น 1 ใน 3 ของผลผลิตทั่วโลก (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2559) พันธุ์ยางแต่ละพันธุ์มีการตอบสนองต่อสภาพพื้นที่และสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะบางพันธุ์ของต่างประเทศที่ถูกนำเข้ามา และบางพันธุ์เป็นพันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือกภายในประเทศ ซึ่งแต่ละพันธุ์จะมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันออกไป ในปัจจุบันคาดว่ายางพาราที่ปลูกในประเทศไทยประมาณ 75% ของพื้นที่ปลูก เป็นพันธุ์ RRIM 600 เพราะมีการปรับตัว และให้ผลผลิตได้ดีในเกือบทุกพื้นที่ ทนทานต่อการกรีดถี่ได้มากกว่าพันธุ์อื่นๆ และมีจำนวนต้นแสดงอาการเปลือกแห้งน้อย ดังนั้นต้นต่อส่วนใหญ่ในปัจจุบันจึงได้มาจากเมล็ดของต้นยางพันธุ์ดีคือ RRIM 600 ซึ่งต้นกล้าเหล่านี้จะมีปัญหาเรื่องการเข้ากันไม่ได้กับตาของต้นพันธุ์ดีน้อย เพราะมาจากพันธุ์เดียวกัน แต่ปัญหาสำคัญคือส่วนใหญ่ระบบรากของยางพันธุ์ดีจะมีความแข็งแรงน้อยกว่าพันธุ์พื้นเมืองมาก และพบว่า ยางพาราพันธุ์ RRIM 600 มีความอ่อนแอต่อโรครากขาว และเชื้อไฟทอปทอรา (กษมา, 2555) นอกจากนี้ Ahmahd (1999) ได้ศึกษาผลของต้นต่อต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้น้ำของยางพาราในสภาวะแล้ง พบว่ายางพันธุ์ RRIM 600 มีความอ่อนแอต่อสภาวะแล้ง เนื่องจากระบบรากไม่สามารถหยั่งลึกลงไปในดินได้ และจากการศึกษาพบว่า ยางพาราที่ติดต่อกับต้นต่อพันธุ์ GT 1 และ RRIM 623 สามารถที่จะปรับตัวให้อยู่ในสภาวะแล้งได้นานกว่า นอกจากยางพาราพันธุ์ RRIM 600 แล้ว ยางพาราพันธุ์ RRIT 251 ยังเป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกในประเทศไทย เนื่องจากมีลักษณะเด่นคือ มีจำนวนต้นที่แสดงอาการเปลือกแห้งน้อย ด้านทานโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อไฟทอปทอรา โรคราแป้ง โรคใบจุดนูน และโรคราสีชมพูระดับปานกลาง ด้านทานโรคเส้นดำระดับดี และด้านทานลมระดับปานกลาง ให้ผลผลิตเนื้อยางสูงมาก รวมทั้งมีความสม่ำเสมอของขนาดลำต้นทั้งแปลงดี ทำให้มีจำนวนต้นเปิดกรีดได้มากเมื่อครบอายุเปิดกรีด แต่ยางพาราพันธุ์ RRIT 251 จะอ่อนแอต่อโรคใบจุด (สำนักงานวิจัยและพัฒนาการเกษตร, 2553)

การผลิตต้นต่อเพื่อใช้สำหรับติดตา ควรใช้ต้นต่อที่มีระบบรากที่แข็งแรง กษมา (2555) ทำการคัดเลือกต้นพันธุ์ยางพาราที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นต้นต่อ พบว่า ต้นกล้ายางพาราพันธุ์ PB 5/51 เป็นพันธุ์ที่มีค่าเฉลี่ยความยาวราก 1,925.19 เซนติเมตร รองจากความยาวรากของต้นกล้าพันธุ์ GT1 (2,356.96 เซนติเมตร) โดยรากของต้นกล้ายางพาราส่วนใหญ่จะเจริญเติบโตได้ดีที่ระดับ

ความลึก 20-40 เซนติเมตร นอกจากนี้ต้นตอยังจำเป็นต้องมีความทนทานต่อการเกิดโรครากขาว จรัสศรี และคณะ (2559) ซึ่งให้เห็นว่า ยางพาราพันธุ์ PB 5/51 มีศักยภาพที่จะนำมาใช้เป็นต้นตอที่ทนทานต่อโรครากขาวได้ เนื่องจากมีการแสดงออกของกลุ่มยีน *PRs* สูงหลังการปลูกถ่ายเชื้อโรครากขาว

2.2 การขยายพันธุ์ยางพารา

การขยายพันธุ์ยางพารา สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด ใช้วิธีการติดตาเขียวหรือติดตาสีน้ำตาล เป็นต้น แต่ในปัจจุบันประเทศไทยไม่นิยมขยายพันธุ์โดยวิธีการใช้เมล็ด เพราะไม่มีสวนเก็บเมล็ดพันธุ์โดยตรง อีกทั้งเมล็ดพันธุ์ที่นำไปปลูกมีการกลายพันธุ์มาก แต่การใช้เมล็ดขยายพันธุ์มักใช้ในการเพาะต้นกล้าเพื่อนำมาผลิตเป็นต้นตอสำหรับติดตาต่อไป โดยการติดตาที่เป็นที่นิยมคือการติดตาเขียวเพราะทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว มีเปอร์เซ็นต์การติดตาสูงมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ การติดตาเขียวจะให้ผลสำเร็จสูงหรือไม่ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ต้นกล้ายาง (ต้นตอ) ต้องมีความสมบูรณ์แข็งแรง มีอายุประมาณ 4 ถึง 8 เดือน ขนาดของลำต้นมีเส้นผ่านศูนย์กลางไม่น้อยกว่า 0.8 เซนติเมตร วัดจากระดับความสูงจากพื้นดิน 10 เซนติเมตร มีลำต้นตั้งตรง โคนรากไม่คดงอ และลอกเปลือกได้ง่าย ซึ่งต้นตอจะเป็นส่วนที่ทำหน้าที่เป็นระบบราก เพื่อหาอาหารหล่อเลี้ยงลำต้น จึงจำเป็นต้องมีความแข็งแรง เจริญเติบโตเร็ว ปราศจากโรคและแมลง และทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดี นอกจากนี้ การคัดเลือกต้นพันธุ์สำหรับใช้เป็นต้นตอ ควรคำนึงถึงความสามารถในการเชื่อมประสานกันของต้นตอกับกิ่งพันธุ์ดีต่างๆ ด้วย (กรมพัฒนาที่ดิน, 2548) กิ่งพันธุ์ดีที่ใช้จะทำหน้าที่เป็นระบบยอดของต้นยาง จึงจำเป็นต้องเป็นกิ่งที่มีตาแข็งแรง และมีความสมบูรณ์ปานกลาง โดยสังเกตจากข้อ ที่ไม่ถี่หรือห่างเกินไป มีขนาดที่เหมาะสม และไม่เป็นโรค รวมถึงต้องได้รับการตรวจสอบแล้วว่าเป็นพันธุ์ยางพาราที่ถูกต้อง และมีอายุ 42 ถึง 49 วัน ลอกเปลือกได้ง่าย ไม่เปราะหรือมีเสี้ยนติดเนื้อไม้ สำหรับฤดูกาลที่เหมาะสมต่อการติดตายาง คือช่วงต้นถึงปลายฤดูฝน แต่หากในแปลงกล้ามีการรดน้ำทุกวัน ก็สามารถติดตาได้ตลอดทั้งปี นอกจากนี้ ความชำนาญของผู้ติดตาก็มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จของการติดตาเป็นอย่างมากด้วยเช่นกัน (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, 2560) การติดตาจะช่วยเปลี่ยนยอดยางพาราที่มีลักษณะไม่ดี ให้เป็นพันธุ์ดีได้ ทำให้ได้ต้นยางพาราที่มีความแข็งแรง สามารถให้ผลผลิตที่สูง ทั้งนี้ยังสามารถขยายพันธุ์ได้จำนวนมาก เพราะกิ่งพันธุ์แต่ละกิ่งจะมีจำนวนตามาก

ขั้นตอนการติดตา สามารถทำได้โดยการเลือกต้นตอที่มีขนาด 0.8 เซนติเมตร เปลือกลอกง่าย และรากไม่คดงอ ส่วนกิ่งพันธุ์ดีต้องลอกง่ายเป็นตาที่สมบูรณ์อยู่บนก้านใบ กรีด 2

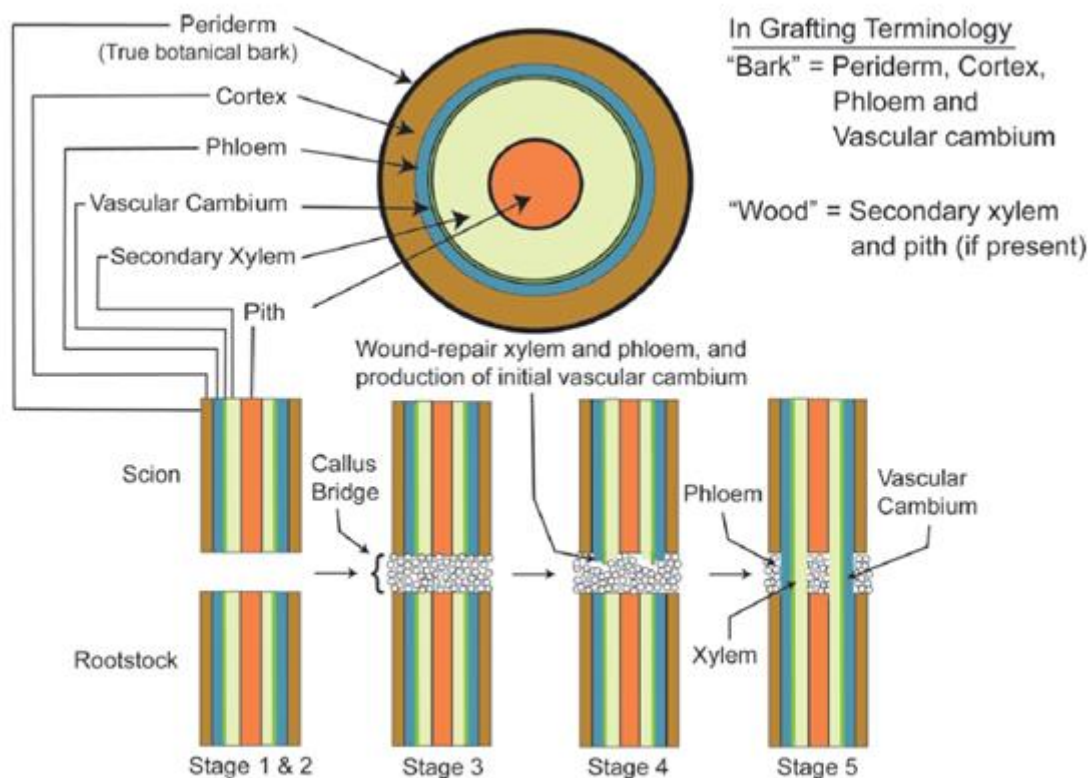
ข้างของต้นตอยาวประมาณ 2 นิ้ว ลอกเปลือกออก ความกว้างของแผลต้องมีขนาดใกล้เคียงกับกิ่งพันธุ์ เลือกกิ่งพันธุ์ที่สมบูรณ์ ตัดกิ่งพันธุ์ให้มีความกว้าง และความยาวใกล้เคียงกับขนาดแผลของต้นตอ อย่าให้แผลชำหรือสกปรก ข้อสำคัญในการตัดกิ่งพันธุ์จะต้องให้มีใบติดอยู่ จึงจะทำให้การติดตาสมบูรณ์ จากนั้นนำกิ่งพันธุ์ที่ตัดเสร็จ ไปติดกับแผลต้นตอ แล้วใช้เทปพันตาให้แน่น โดยพันจากด้านล่างขึ้นด้านบน เพื่อป้องกันน้ำและสิ่งสกปรกเข้าไปในแผล ต้นตออย่างพาราที่ติดตาแล้ว ต้องดูแล และรดน้ำให้ดินมีความชื้นอยู่เสมอ ลักษณะของตาที่ติดและพร้อมที่จะถอนเป็นยางตาเขียว จะสังเกตจากรอยแผลจะเป็นสีน้ำตาล (ฉฤทธิ, 2559)

2.3 การประสานตัวของรอยต่อ

การติดตาท่อกิ่งเป็นการนำชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช 2 ชนิด มาต่อเชื่อมเข้าด้วยกัน สามารถเจริญ และพัฒนาเป็นพืชต้นเดียวกันได้ โดยการเชื่อมประสานของรอยต่อเกิดขึ้นได้เนื่องจากการแบ่งตัวของแคลลัสจากส่วนของพันธุ์ดี และจากต้นตอ หลังจากนั้นจะมีการสร้างท่อลำเลียงน้ำ และอาหาร รวมทั้งมีการรวมระบบท่อลำเลียง ซึ่งความสำเร็จในการเชื่อมประสานจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักๆ คือ

1. การติดแน่น (adhesion) ของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี
2. การเชื่อมของแคลลัส (callus bridge)
3. การสร้างระบบลำเลียงเชื่อมผ่านรอยต่อเข้าด้วยกัน

โดยรายละเอียดภายในกิ่งพืชที่มีการต่อเชื่อมประสานของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีใน ระยะต่างๆ ดังแสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการเชื่อมประสานกันระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี

ที่มา: Hartmann และคณะ (1997)

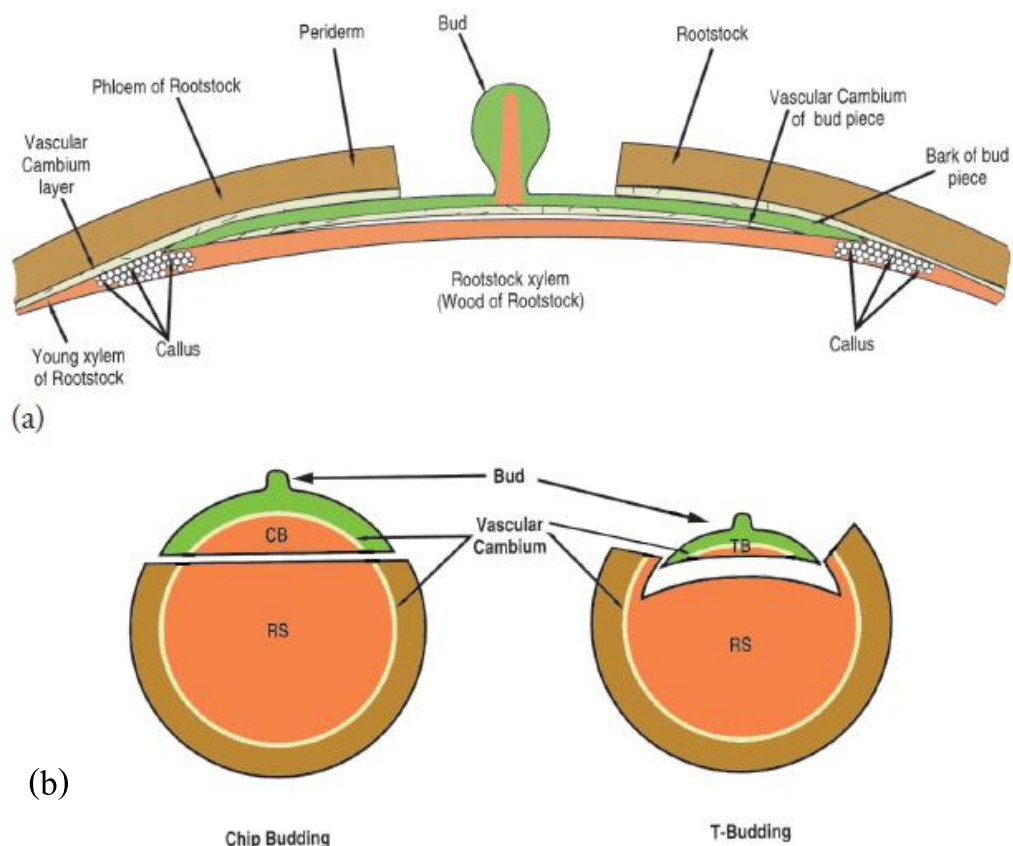
จากภาพที่ 1 มีรายละเอียดดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 เป็นการจัดเรียงท่อน้ำท่ออาหารของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี ให้มีเนื้อเยื่อแคมเบียมของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีตรงกัน หากท่อน้ำท่ออาหารของกิ่งพันธุ์ดี และต้นตอไม่เชื่อมต่อกัน จะไม่สามารถส่งน้ำ และธาตุอาหารจากกิ่งพันธุ์ไปยังต้นตอได้ ซึ่งส่งผลให้ความสำเร็จของการต่อกิ่งน้อยลง

ขั้นตอนที่ 2 เป็นการตอบสนองต่อการรักษาบาดแผลของพืช โดยการสร้างชั้นเนื้อเยื่อสีน้ำตาล (necrotic layer) ซึ่งเกิดจากความเสียหายของเซลล์ภายหลังการได้รับบาดแผลทั้งในต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี โดยชั้นเนื้อเยื่อสีน้ำตาลจะหายไปภายหลัง หรืออาจจะถูกเก็บไว้ระหว่างเนื้อเยื่อแคลลัสที่ถูกสร้างขึ้นใหม่อย่างรวดเร็วจากเนื้อเยื่อพาราเนไคมาที่ไม่ได้รับความเสียหาย เนื้อเยื่อแคลลัสบางส่วนถูกดันออกมาข้างนอกบาดแผลเรียกว่า wound periderm ซึ่งเป็นส่วนที่ช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำทางบาดแผลและป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อจุลินทรีย์ โดยการติดแน่น (adhesion) ระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์มีซิเมนต์ของผิวเซลล์แคลลัสจากทั้งสองส่วนช่วยในการยึดเกาะ หลังจากนั้นจะเกิดการเชื่อม (fusion) ประสานกันของรอยต่อ

ขั้นตอนที่ 3 เป็นการเชื่อมส่วนของแคลลัส ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญสำหรับความสำเร็จในการต่อกิ่ง ภายใต้นี้จะมีการแบ่งเซลล์เพื่อสร้างแคลลัสอย่างต่อเนื่องจนเต็มช่องว่างระหว่างเซลล์

ขั้นตอนที่ 4 เป็นการซ่อมแซมบาดแผล ทั้งท่อน้ำ และท่ออาหาร โดยการพัฒนาการเชื่อมต่อระหว่างวาสคิวลาร์แคมเบียกับแคลลัส ขั้นตอนนี้เริ่มมีองค์ประกอบของ xylem tracheary elements และแคลลัสเริ่มมีการพัฒนาไปเป็นท่อลำเลียงอาหารเพิ่มขึ้น จากนั้นวาสคิวลาร์แคมเบียจะก่อตัวขึ้นระหว่างมัดท่อลำเลียง ซึ่งวาสคิวลาร์แคมเบียสามารถแบ่งตัวเป็น secondary xylem และ secondary phloem ได้ ซึ่งส่งผลต่อความสำเร็จในการเชื่อมประสานระหว่างรอยต่อ และขั้นตอนที่ 5 เป็นขั้นตอนที่วาสคิวลาร์แคมเบีย secondary xylem และ secondary phloem ถูกสร้างอย่างสมบูรณ์

ตัวอย่างการเชื่อมประสานของรอยต่อระหว่างต้นตอและกิ่งพันธุ์ในการติดตาแบบ T-budding (TB) และ Chip budding (CB) โดยการเชื่อมประสานจะเกิดขึ้นภายหลังการเอากิ่งพันธุ์แปะติดบนต้นตอ และแคลลัสจากต้นตอพัฒนาจากส่วนที่เรียกว่า young xylem ไปเชื่อมต่อกับแคลลัสที่เกิดจากแคมเบีย และ young xylem ของกิ่งพันธุ์ ซึ่งจะเห็นได้จากภาพหน้าตัด (cross section) ของการติดตาแบบ TB และ CB และต้นตอ ดังแสดงในภาพที่ 2 ความแตกต่างของวิธีการขยายพันธุ์โดยการติดตาต่อกิ่ง จะมีผลต่อการเชื่อมประสานของรอยต่อ ในกรณี CB จะเป็นวิธีที่มีการเชื่อมประสานของรอยต่อ และแคมเบียภายในกิ่งพันธุ์ โดยต้นตอมีความพร้อม และเจริญได้เร็วกว่า TB เนื่องจากกิ่งพันธุ์ในวิธี TB จะสอดเข้าไปใต้เปลือกของต้นตอทำให้แคมเบียของกิ่งพันธุ์และส่วนของต้นตอไม่อยู่ในแนวที่เหมาะสม จึงทำให้เกิดการต่อเชื่อมยากยิ่งขึ้น



ภาพที่ 2 การวางกิ่งพันธุ์ในขนาดแผลของต้นตอ และเกิดการเชื่อมประสานของรอยต่อ (a)

และรูปหน้าตัดของการติดตาแบบ Chip budding และ T-budding (b)

ที่มา: Hartmann และคณะ (1997)

นอกเหนือจากวิธีการที่ใช้ในการขยายพันธุ์แล้ว ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการเชื่อมประสานของรอยต่อ ยังประกอบด้วย ชนิดพืช ความชำนาญในการติดตาท่อกิ่ง รวมถึงสภาพแวดล้อมในขณะทำ และหลังการต่อเชื่อม ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น ความสมบูรณ์ของต้นตอ และการติดเชื้อไวรัส โรค และแมลง เป็นต้น (จรัญ, 2546)

2.4 การพัฒนารอยเชื่อมประสานของยางพารา

การขยายพันธุ์พืชโดยวิธีการติดตานั้น สิ่งที่ต้องคำนึงเป็นอันดับแรกคือการเชื่อมประสานกันของรอยต่อ เนื่องจากหากต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีประสานกัน ได้ไม่ดี จะส่งผลกระทบต่อเจริญเติบโต และการให้ผลผลิตของยางพารา โดยณฤทธิ (2559) ได้ทำการศึกษาพัฒนาการระหว่าง

รอยต่อของต้นตอพันธุ์ดั้งเดิม และพันธุ์ RRIM 600 กับกิ่งพันธุ์ RRIM 600 พบว่า ภายหลังการติดตาม 5 วัน รอยเชื่อมประสานมีการพัฒนาของเนื้อเยื่อแคลลัสขึ้นเล็กน้อย ซึ่งการพัฒนาส่วนใหญ่เกิดจากกิ่งพันธุ์ดี โดยการใส่กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ติดบนต้นตอพันธุ์ RRIM 600 มีการพัฒนาของเนื้อเยื่อแคลลัสเร็วกว่าพันธุ์อื่นๆ จนเกือบเต็มช่องว่างของบาดแผล และพบว่า 10 วันหลังการติดตาม เนื้อเยื่อแคลลัสของต้นตอกับกิ่งพันธุ์ดีสามารถเพิ่มปริมาณ และแทรกเข้าไปในช่องว่างของบาดแผลได้อย่างรวดเร็ว เกิดเป็นสะพานแคลลัสที่ทำหน้าที่เชื่อมทั้งสองส่วนเข้าด้วยกัน จากนั้นแคลลัสบริเวณที่อยู่ใกล้ท่อน้ำของต้นตอ และท่อน้ำของกิ่งพันธุ์ดี เริ่มพัฒนาเป็นแคมเบียม และแบ่งเซลล์ให้เนื้อเยื่อท่อน้ำใหม่ เพื่อทำหน้าที่ลำเลียงน้ำ แต่การพัฒนาของท่อน้ำใหม่ที่อายุ 20 วันหลังการติดตามยังไม่สมบูรณ์ ในช่วงนี้ยังพบ latex cell แทรกอยู่ในเนื้อเยื่อสร้างใหม่อีกด้วย จากการทดสอบความเข้ากันได้ระหว่างต้นตออย่างพารา 5 กลุ่ม ที่เก็บจากแหล่งต่างๆ ประกอบด้วย กลุ่มที่ 1 ยางพาราพันธุ์พื้นเมือง บริเวณคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, บ้านจันดี อำเภอนาบอน จังหวัดนครศรีธรรมราช ซึ่งแยกเป็น กลุ่มที่ 2 เมล็ดใหญ่ กลุ่มที่ 3 เมล็ดกลาง กลุ่มที่ 4 เมล็ดเล็ก และกลุ่มที่ 5 เก็บเมล็ดพันธุ์จากบ้านจันดี อำเภอนาบอน จังหวัดนครศรีธรรมราช (แปลงที่ 2) ติดตามด้วยกิ่งพันธุ์ RRIM 600 จรัสศรี และคณะ (2557) พบว่า เนื้อเยื่อแคลลัสจะพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อลำเลียงได้อย่างสมบูรณ์ที่อายุ 30 วันหลังการติดตาม โดยเซลล์ที่สร้างใหม่จะมีการยืดขยายเป็นแนวยาว เรียงตัวกันอย่างหนาแน่นจนไม่สามารถมองเห็นรูปร่าง และขนาดของเซลล์นั้นได้ อีกทั้งยังมีลักษณะกลมกลืนไปกับเซลล์บริเวณรอบข้าง แต่รอยต่อของต้นตอและกิ่งพันธุ์ดีบางคู่ มีรอยแผลที่เกิดจากการไม่เชื่อมประสานกันของรอยต่อบางส่วน มีเซลล์ตายเล็กน้อย แต่ไม่ทำให้รอยเชื่อมประสานแตกหลุดออกจากกัน เช่น การใส่กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ติดตามบนต้นตอในกลุ่มที่ 3 ดังนั้น การเชื่อมประสานกันของรอยแผล จึงอาจเป็นตัวบ่งชี้ถึงความสามารถในการเชื่อมต่อเข้ากันได้ระหว่างต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี

2.5 อิทธิพลของต้นตอการเจริญเติบโตและผลผลิตของกิ่งพันธุ์ดี

ยางพาราที่ใช้ในการผลิตต้นตอแต่ละพันธุ์มีความสามารถในการเข้ากันได้กับกิ่งพันธุ์ดีแตกต่างกันด้วย จรินทร์ และคณะ (2540) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของต้นตอกับกิ่งพันธุ์เพื่อทดลองหาต้นตอที่มีการเจริญเติบโตได้ดี มีผลการติดตามสำเร็จสูง และส่งเสริมให้ได้รับผลผลิตสูง เมื่อติดตามด้วยยางพันธุ์ดี วางแผนการทดลองแบบ Split plot in RCB จำนวน 2 ซ้ำ การทดลองศึกษา 2 ปัจจัย คือ พันธุ์ยางที่ใช้ติดตาม (scion) มี 6 พันธุ์ คือ GT 1, PR 255, RRIM 600, PR 261, PB 5/51 และ PB 235 ปัจจัยที่ 2 คือ พันธุ์ยางที่ใช้เป็นต้นตอ (rootstock) มี 4 พันธุ์ คือ ต้นตอ

จากเมล็ดขางพันธุ์ GT 1, PB 5/51, RRIM 600 และ PR 255 ดำเนินการทดลองที่สถานีทดลองยางขุนทะเล อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี ระยะเวลาทำการทดลองปี พ.ศ. 2525-2540 เก็บเมล็ดขางพันธุ์ที่จะใช้เป็นตัวต่อจากสวนยางขนาดเล็ก แล้วนำมาเพาะในแปลงเพาะเมล็ด หลังจากเมล็ดเริ่มงอกจึงนำไปปลูกในแปลงกล้าขางเมื่อเดือนสิงหาคม 2525 ตัดขางเดือนกรกฎาคม 2526 ย้ายต้นขางที่ตัดแล้วลงปลูกในแปลงทดลองในสภาพต้นต่อตาเขียวเมื่อเดือนสิงหาคม 2526 เปิดกรีดเมื่อเดือนพฤษภาคม 2534 แล้วศึกษาถึงการเจริญเติบโตของต้นต่อขางพันธุ์ต่างๆ ในระยะที่เป็นต้นกล้า ผลการติดตามสำเร็จ การเจริญเติบโตของต้นขางหลังตัดขางเมื่อย้ายไปปลูกในแปลงทดลอง และผลผลิตของขางจากการกรีดเป็นระยะเวลา 5 ปี ผลปรากฏว่า เมล็ดขางพันธุ์ GT 1, RRIM 600, PB 5/51 และ PR 255 ที่เก็บจากสวนยางขนาดเล็กสามารถใช้เป็นตัวต่อเพื่อขยายพันธุ์ได้ โดยเมล็ดขางพันธุ์ GT 1 เหมาะสมที่จะใช้เป็นตัวต่อของขางพันธุ์ PB 235 และ RRIM 600 เมล็ดขางพันธุ์ PB 5/51 เหมาะสมที่จะใช้เป็นตัวต่อของขางพันธุ์ PB 235 และ PR 255 เมล็ดขางพันธุ์ RRIM 600 เหมาะสมที่จะใช้เป็นตัวต่อของขางพันธุ์ RRIM 600 และ PB 235 และเมล็ดขางพันธุ์ PR 255 เหมาะสมที่จะใช้เป็นตัวต่อของขางพันธุ์ RRIM 600 จากการทดลองพบว่ากิ่งพันธุ์ RRIM 600 เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการติดตามต้นต่อพันธุ์อื่นๆ ได้หลายพันธุ์ ซึ่งคล้ายกับการทดลองของวิทยา และคณะ (2560) ที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับอิทธิพลของต้นต่อต่อความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อจากการติดตามต้นต่อขนาดเล็ก ซึ่งใช้ขางพาราพันธุ์ RRIT 408, RRIT 251, RRIM 600 และ BPM 24 เป็นต้นต่อ และติดตามด้วยกิ่งพันธุ์ RRIT 251, RRIT 408, RRIT 226 และ RRIM 600 หลังจากติดตามและวางเลี้ยงต้นขางชำถุงขนาดอายุ 6 สัปดาห์ พบว่า การติดตามต้นต่อขางพันธุ์ RRIM 600 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของยอดมากที่สุด รองลงมา คือพันธุ์ RRIT 251 โดยพันธุ์ขางพาราที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุดบนต้นต่อขางพันธุ์ RRIT 408, RRIT 251, RRIM 600 และ BPM 24 คือขางพันธุ์ RRIT 408 จากการทดลองสังเกตได้ว่ากิ่งพันธุ์ RRIT 408 เมื่อนำมาติดตามต้นต่อพันธุ์ต่างๆ มีการเจริญเติบโตของยอดที่ดี แสดงให้เห็นว่า ขางพันธุ์ RRIT 408 สามารถเข้ากับต้นต่อพันธุ์อื่นๆ ได้ดี รัชนิกร และจรัสศรี (2555) ได้ศึกษาอิทธิพลของต้นต่อขางพาราพันธุ์พื้นเมืองจาก 5 แหล่งในภาคใต้ต่อการเจริญเติบโตของกิ่งพันธุ์ RRIM 600 พบว่า ต้นต่อจากการเพาะเมล็ดที่เก็บมาจากที่ต่างๆ ส่งผลต่อการเจริญเติบโตทางด้านความสูง เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น และจำนวนใบของกิ่งพันธุ์ RRIM 600 ได้แตกต่างกัน สอดคล้องกับ Sobhana และคณะ (2001) ศึกษาผลของต้นต่อที่ไม่ระบุพันธุ์ และกิ่งพันธุ์ RRIT 105, RRIT 208, RRIM 600, GT1 และ GII ต่อลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของขางพารา 5 พันธุ์ พบว่าความแตกต่างของอัตราการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นอิทธิพลที่เกิดจากต้นต่อ และพบว่าปริมาณน้ำตาล (total soluble sugars และ reducing sugars) สารประกอบฟีนอลิก และปริมาณกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน เกิดจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างต้นต่อ และ

กึ่งพันธุ์ Goncalves และ Martins (2002) รายงานว่า ผลผลิตของยางพารามีความแตกต่างกัน ประมาณ 18-20% จากการใช้ต้นตอพันธุ์ต่างๆ แสดงให้เห็นว่าต้นตอมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโต และการให้ผลผลิตน้ำยาง อีกทั้งต้นตอที่ดีจะสามารถเข้ากันได้ดีกับกึ่งพันธุ์ดี จะทำให้การเจริญเติบโตทางด้านลำต้นในระยะแรกรวดเร็ว ส่งผลให้ยางพาราสามารถตั้งตัวได้เร็ว และมีการเจริญเติบโตดีในแปลงปลูก โดยยางพาราพันธุ์ RRIM 600 เป็นพันธุ์ที่มีความสามารถเข้ากันได้ดีกับต้นตอหลายพันธุ์ แต่จากการทดลองพบว่าการใช้ต้นตอพันธุ์ IAN 873 จะให้ผลดีที่สุด นอกจากนี้ Cardinal และคณะ (2007) กล่าวว่า การติดตามพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตอพันธุ์ PB 235 ให้ผลผลิตสูงที่สุด รองลงมาคือการติดตามพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตอพันธุ์ IAN 873 จากงานวิจัยดังกล่าวจะเห็นได้ว่าต้นตอที่ใช้ในการติดตามยางพารามีอิทธิพลอย่างมากต่อการเจริญเติบโต และปริมาณผลผลิตน้ำยาง ซึ่งผลดังกล่าวอาจเกิดจากระดับความสามารถในการเข้ากันได้ของต้นตอ และกึ่งพันธุ์ดีที่มีพันธุ์กรรมแตกต่างกัน

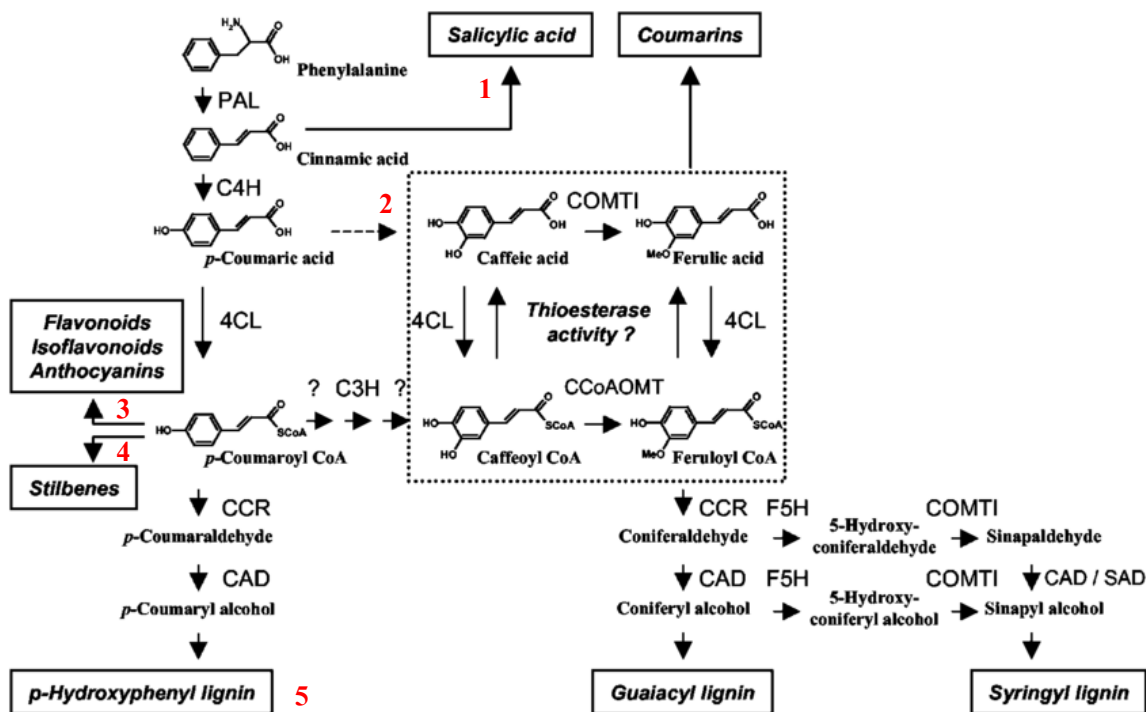
2.6 การสร้างสารสีน้ำตาลระหว่างการพัฒนาของรอยต่อ

การเกิดสารสีน้ำตาลมีสาเหตุมาจากเอนไซม์ที่เกิดขึ้นภายหลังพืชได้รับบาดแผล หรือการกระทบกระแทก ซึ่งสารสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นจะสามารถช่วยป้องกันการเข้าทำลายของแมลง และจุลินทรีย์ต่างๆ ได้ (จริงแท้, 2549) อย่างไรก็ตามการเกิดสารสีน้ำตาลบริเวณรอยต่อระหว่างต้นตอ และกึ่งพันธุ์ดี นำไปสู่การลดลงของแป้งในต้นตอ และการสะสมสารประกอบฟีนอลิกที่เป็นพิษ ซึ่งส่งผลต่อการเข้ากันได้ของต้นตอ และกึ่งพันธุ์ดี (นันทิยา, 2542) ปัญหาของความเข้ากันไม่ได้ของเนื้อเยื่อระหว่างต้นตอ และกึ่งพันธุ์ดี อาจมีผลทำให้เกิดลักษณะการตายจากยอด (dieback) ของต้นพืชหลังจากปลูก โดยพบว่าเมื่อพืชเกิดบาดแผลจากการติดตามหรือต่อกิ่ง พืชจะกระตุ้นการผลิตสารประกอบฟีนอลิกสูงขึ้น ดังนั้น หากพบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในบริเวณที่มีการติดตามมาก จะส่งผลให้เกิดการไม่เข้ากันของเนื้อเยื่อ (Darikova *et al.*, 2011) วิทยา และคณะ (2560) รายงานว่า เมื่อตัดตามแนวยาว และแนวขวางจากส่วนต่างๆ ของกึ่งพันธุ์ RRIT 251 ที่ติดตามบนต้นตอพันธุ์ RRIM 600 ที่อายุ 30 90 150 และ 240 วัน ได้แก่ ส่วนเหนือรอยต่อระหว่างต้นตอ และกึ่งพันธุ์ ส่วนของรอยต่อระหว่างต้นตอ และกึ่งพันธุ์ และส่วนของต้นตอ นำไปย้อมด้วยสาร Phloroglucinol-HCL ซึ่งใช้ในการย้อมสารประกอบในกลุ่มลิกนิน พบว่า อายุของต้นตอมีผลต่อการสร้างสารสีน้ำตาลบริเวณรอยต่อระหว่างต้นตอและกึ่ง และใ้รอยต่อระหว่างต้นตอและกึ่งพันธุ์ โดยการสร้างสารสีน้ำตาลส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นบริเวณรอยเชื่อมต่อระหว่างต้นตอและกึ่งพันธุ์ รองลงมาคือบริเวณของ

แกนต้นตอ ซึ่งอายุของต้นตอที่เพิ่มมากขึ้นมีผลต่อการสร้างสีสารน้ำตาลมากขึ้นตามลำดับ แม้จะไม่มี ความแตกต่างทางสถิติกันชัดเจน

การสะสมสารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านออกซิเดชั่นที่พบมากในอาหาร ในธรรมชาติพบมากกว่า 8,000 ชนิด และเป็นสารทุติยภูมิที่พืชสร้างขึ้น โดยมีโครงสร้างประกอบด้วย หมู่ไฮดรอกซีเกาะอยู่กับวงแหวนเบนซีน สามารถจำแนกชนิดของสารประกอบฟีนอลิกเป็นกลุ่มต่างๆ ดังนี้ (1) กลุ่มกรดฟีนอลิกที่ได้จาก hydroxybenzoic acids ได้แก่ gallic acid และ salicylic acid เป็นต้น (2) กรดฟีนอลิกที่มาจาก hydroxycinnamic acid ได้แก่ caffeic, ferulic และ coumaric acid (3) กลุ่มฟลาโวนอยด์ เป็นกลุ่มใหญ่ที่ประกอบด้วย ฟลาโวนส์ ไอโซฟลาโวนส์ ฟลาโวนอลส์ แอนโทไซยานินส์ และฟลาโวนอลส์ (4) กลุ่มสติลเบิน (stilbenes) และ (5) กลุ่มลิกนิน และโพลีเมอร์ของลิกนิน (ลือชัย, 2011) แสดงดังภาพที่ 3 โดยสารประกอบฟีนอลิกจะถูกสังเคราะห์ในเวซิกเคิลของ rough endoplasmic reticulum และจะถูกสะสมในแวคิวโอลของเซลล์พืช (Parham and Kaustinen, 1997)



ภาพที่ 3 การจำแนกกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในวิถี phenylpropanoid

ที่มา : Hoffmann และคณะ (2003)

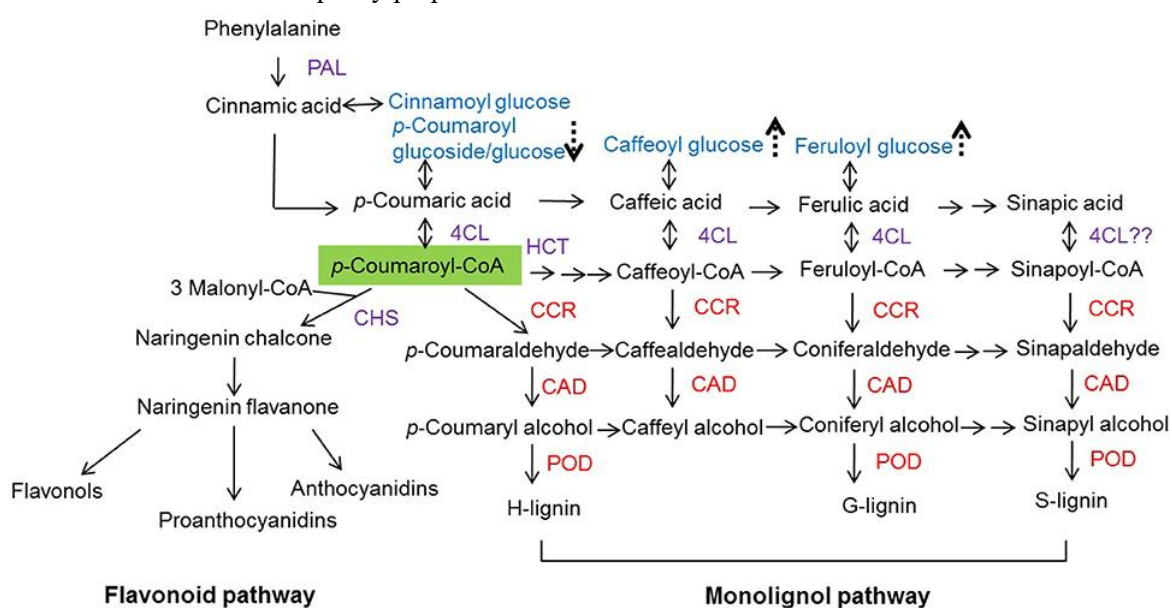
สารประกอบฟีนอลิกมีความสำคัญต่อระบบสรีรวิทยา การเจริญเติบโต และระบบการสืบพันธุ์ของพืช อีกทั้งยังส่งผลต่อความเข้ากันได้ระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสารประกอบฟีนอลิกที่พืชสร้างขึ้นว่าเป็นกลุ่มใด หากเป็นสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่มฟลาโวนอยด์ จะเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อ ซึ่งจะส่งผลต่อความเข้ากันไม่ได้ของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี โดย Fernandez-Garcia และคณะ (2004) รายงานว่าหากพบสารฟลาโวนอยด์ในปริมาณสูง จะทำให้เกิดปัญหาในการเชื่อมของรอยต่อระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีของมะเขือเทศ ในทางตรงกันข้ามพืชจะพยายามสังเคราะห์สารลิกนินเพื่อเป็นการป้องกันตัวเองเมื่อพืชเกิดบาดแผล การเชื่อมต่อระหว่างต้นตอกับกิ่งพันธุ์ของพืชนั้นจะต้องเกิดการเชื่อมต่อกันของเนื้อเยื่อลำเลียงน้ำ และเนื้อเยื่อลำเลียงอาหาร ซึ่งการสร้างเนื้อเยื่อเหล่านี้จะเกิดจากการสร้างสารลิกนิน โดยปริมาณลิกนินที่สร้างขึ้นระหว่างการเชื่อมต่อรอยแผลจะช่วยให้เกิดการเชื่อมรอยต่อที่แข็งแรงในต้นตอ และกิ่งพันธุ์ที่สามารถเข้ากันได้ (Buchloh, 1960) เนื่องจากลิกนินมีคุณสมบัติทำให้เนื้อไม้แข็งแรง และเป็นผนังเซลล์ชั้นที่สองที่มีผนังเซลล์หนา เกิดจากการพัฒนาของท่อลำเลียงน้ำ และท่ออาหาร ซึ่งเกี่ยวข้องกับหลายกระบวนการพื้นฐานของการเจริญเติบโตของพืช รวมถึงการแบ่งตัว และการขยายตัวของเซลล์ท่อลำเลียง (สมจินตนา และคณะ, 2551) จะส่งผลต่อความเข้ากันได้ระหว่างต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี ดังนั้น การศึกษาการสะสมของลิกนินที่ส่วนเชื่อมระหว่างเนื้อเยื่อต้นตอและกิ่งพันธุ์ นั้นสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อระหว่างต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี

2.7 กระบวนการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก

การติดตา ต่อกิ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้พืชเกิดบาดแผล โดยธรรมชาติพืชจะมีโครงสร้าง และส่วนประกอบที่เหมาะสมสำหรับการป้องกันตัวเองจากเชื้อโรคหรือบาดแผล ซึ่งประกอบด้วยสิ่งกีดขวางทางกายภาพ (physical barrier) เช่น ความหนาของคิวติน และความเหนียวของผนังเซลล์ด้านนอก และสิ่งกีดขวางทางเคมี (chemical barrier) (Sánchez-Sánchez and Morquecho-Contreras, 2017) หรือปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเซลล์ และวิถีสำคัญที่เกี่ยวข้องต่อระบบการป้องกันตัวเองของพืช คือวิถี phenylpropanoid ที่มียีน *PAL* เป็นยีนตัวแรกของวิถี โดยยีนดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในการป้องกันตัวเองของพืช ซึ่งมีความสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารต่างๆ ในกลุ่ม phenylpropanoid (Dixon and Paiva, 1995)

Yeh และคณะ (2014) รายงานว่าสารในกลุ่ม phenylpropanoid เป็นผลผลิตทางธรรมชาติที่ได้จากกรดอะมิโน L-phenylalanine ผ่านกระบวนการแยกหมู่อะมิโนโดยเอนไซม์ L-phenylalanine ammonia lyase ตัวอย่างเช่น สารกลุ่มที่มี C_6C_3 phenylpropane เป็นองค์ประกอบ ซึ่งเป็นกรด hydroxycinnamic เช่น sinapic acid เป็นต้น และกลุ่ม monolignols เช่น coniferyl

alcohol เป็นต้น ซึ่งสารดังกล่าวสามารถสังเคราะห์กลายเป็นลิกนินได้ และสาร phenylpropanoid กลุ่มที่มีความซับซ้อน ซึ่งถูกสร้างขึ้นมาจากการรวมกันของ phenylpropane ที่ได้จากการดอะซิเตต ผ่านทาง malonyl coenzyme A สารกลุ่มนี้ประกอบด้วย flavonoid, isoflavonoids และ stilbenes ซึ่งสารประกอบที่ได้จากกระบวนการ phenylpropanoid จะเรียกว่า สารประกอบฟีนอลิก โดยยีนที่สำคัญและมีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ *PAL*, *CCoAOMT*, *CHS*, *4CL* และ *CAD* เป็นต้น ยีนเหล่านี้จะถูกผลิตขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากพืชได้รับตัวกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อม เช่น การเข้าทำลายของเชื้อโรคหรือการเกิดบาดแผล โดยกระบวนการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในวิถี phenylpropanoid ได้แสดงดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 วิถี phenylpropanoid

ที่มา: Yeh และคณะ (2014)

PAL เป็นยีนที่มีความสำคัญในการป้องกันตนเองของพืช มีรายงานจำนวนมากที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของยีนนี้ เพื่อบ่งชี้เกี่ยวกับระบบการป้องกันตัวเองหรือการสร้างสารชนิดอื่นๆ (อุไรวรรณ และคณะ, 2560) โดยยีน *PAL* ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนสาร phenylalanine ให้เป็น cinnamic acid ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ลิกนิน และสารประกอบฟีนอลิกอื่นๆ โดยการแสดงออกของยีน *PAL* จะเพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโตหรือเมื่อได้รับสภาวะเครียดต่างๆ เช่น เชื้อก่อโรค ความร้อน การเกิดบาดแผล และฮอร์โมน เป็นต้น จากนั้น cinnamic acid จะได้รับการกระตุ้นจากยีน *Cinnamate 4-Hydroxylase (C4H)* ให้เปลี่ยนสภาพเป็น *p-coumaric acid* และจะเปลี่ยนเป็น *p-coumaroyl CoA* โดยยีน *4-Coumarate:CoA ligase (4CL)* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ

ขั้นตอนการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก จากนั้น *p*-coumaroyl CoA จะไปจับกับ 3 malonyl CoA ซึ่งจะทำให้ได้ผลผลิตคือ chalcone ที่ต่อมาจะถูกเปลี่ยนไปเป็น flavanone ซึ่งอยู่ในกลุ่ม flavonoid โดยการทำงานของเอนไซม์ chalcone isomerase (CHI) ผ่านการควบคุมของยีน chalcone synthase (*CHS*) (Hahlbrock and Scheel, 1989) ทั้งนี้พืชจะพยายามรักษาตัวเองโดยการเปลี่ยนเส้นทางของการสังเคราะห์สาร ทั้งนี้ยีน *PAL* และยีน *CAH* และ *4CL* จะทำงานตามปกติ และ *p*-coumaroyl CoA จะไม่ไปจับกับ 3 malonyl CoA แต่จะถูกเปลี่ยนให้เป็น alcohol โดยการควบคุมของยีน *Cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD)* กุหลาบ และประสาธน์ (2548) กล่าวไว้ว่าหากยีนดังกล่าวมีการแสดงออกอย่างเต็มที่จะทำให้ได้ลิกนินที่มีคุณภาพสูง นอกจากนี้ยีน *CCoAoMT* มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ monolignin ซึ่งมีการยืนยันว่า ยีนดังกล่าวมีบทบาทในการต้านทานโรคในพืช และการป้องกันตัวเองจากการเกิดบาดแผล ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Whetten และ Sederoff (1995) โดยกล่าวว่าเอนไซม์ที่น่าจะเป็นตัวควบคุมการสังเคราะห์ลิกนิน มี 3 เอนไซม์คือเอนไซม์ *PAL* *CAD* และ *4CL* ซึ่ง *CAD* เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารในกลุ่มแอลดีไฮด์คือ *p*-coumaroyl aldehyde, coniferyl aldehyde และ sinapyl aldehyde ไปเป็นสารในกลุ่มแอลกอฮอล์คือ *p*-coumaroyl alcohol, coniferyl alcohol และ sinapyl alcohol ในปฏิกิริยาเคมีของการสังเคราะห์สารลิกนินก่อนที่สารแอลกอฮอล์เหล่านี้จะรวมตัวกันเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่โดยการกระตุ้นของ POD และจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของทรานสคริปโตมในการเข้ากันได้และเข้ากันไม่ได้ของต้นตอและกิ่งพันธุ์ลินจี Chen และคณะ (2017) รายงานว่า ยีน *CAD* เป็นยีนที่มีความสัมพันธ์กับการสังเคราะห์สารลิกนิน จะช่วยในการสมานบาดแผลของพืช โดยยีน *CAD* จะมีระดับการแสดงออกของยีนสูงในกลุ่มที่มีความสามารถในการเข้ากันได้ดี ยีน *CAD* จึงเป็นยีนที่น่าสนใจ สำหรับการนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงความเข้ากันระหว่างต้นตอและกิ่งพันธุ์

พรทิพย์ (2559) ได้ทำการศึกษา ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *PAL* และสารประกอบฟีนอลิกต่อความสามารถในการเข้ากันได้ของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ยางพาราต่างๆ ผลแสดงให้เห็นว่า ยีน *HbPAL* ในต้นตอพันธุ์พื้นเมืองกับกิ่งพันธุ์ดี RRIM 600 และ RRIT 251 หลังจากการติดตาม 7 14 21 และ 28 วัน มีการแสดงออกของยีน *HbPAL* ที่สูงในวันที่ 7 หลังจากการติดตาม โดยในกิ่งพันธุ์ RRIM 600 ที่ทำการติดตามบนต้นตอพันธุ์ RRIM 623 (RRIM 600 / RRIM 623) มีระดับการแสดงออกของยีน *HbPAL* สูงที่สุด มีค่าการแสดงออกของยีนมากกว่า 19 เท่า ในกิ่งพันธุ์ RRIT 251 มีการแสดงออกของยีนสูงที่สุดบนต้นตอพันธุ์พื้นเมืองบางรัก (B) (RRIT 251 / B) มีค่าการแสดงออกของยีนมากกว่า 2.5 เท่า ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งในกิ่งพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 ที่ได้รับการติดตามบนต้นตอพันธุ์ต่างๆ พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ในส่วนการเจริญเติบโตและการพัฒนาของกิ่งพันธุ์ดี RRIM 600 และ RRIT 251 หลังการติดตาม พบว่ากิ่งพันธุ์

RRIM 600 มีการเจริญเติบโต และการพัฒนาหลังการติดตามในกิ่งพันธุ์ดี ที่ดีกว่ากิ่งพันธุ์ RRIT 251 และพบว่ากิ่งพันธุ์ดี RRIM 600 ที่ทำการติดตามบนต้นตอพันธุ์ RRIM 600 (RRIM 600/RRIM 600) มีการเจริญเติบโต และการพัฒนาของตาน้อยที่สุด และไม่สอดคล้องกับระดับการแสดงออกของยีน *HbPAL* ส่วนในกิ่งพันธุ์ RRIT 251 ที่ติดตามบนยางพาราพันธุ์พื้นเมืองบางรัก (RRIT 251 / B) มีการเจริญเติบโต และการพัฒนาของตาน้อยที่สุด สอดคล้องกับการแสดงออกของยีน *HbPAL* ที่มีระดับการแสดงออกที่สูงที่สุด

การศึกษาการแสดงออกของยีน *PAL* และยีน *CAD* หลังทำการติดตามที่ระยะเวลาต่างๆ มีความสอดคล้องกับความเข้ากันได้ของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี จึงอาจนำมาประยุกต์ใช้ในการทำนายเบื้องต้นถึงระดับความเข้ากันได้ เพื่อคัดเลือกต้นตอที่สามารถเข้ากันได้กับกิ่งพันธุ์ดี นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของรอยต่อระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี เช่น ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกหรือลิกนินที่สร้างขึ้นระหว่างการเชื่อมต่อรอยแผล ซึ่งส่งผลต่อความแข็งแรงระหว่างการเชื่อมรอยต่อในต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี ดังนั้นการศึกษาถึงการแสดงออกของยีน *PAL* หรือ *CAD* และการสร้างสารประกอบฟีนอลิกหรือปริมาณลิกนิน อาจนำไปใช้ในการคัดเลือกต้นตอที่มีความสามารถในการเข้ากันได้กับกิ่งยางพาราพันธุ์ดี ซึ่งมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต และผลผลิตยางพาราในแปลงปลูก เพื่อการผลิตยางพาราที่ให้ผลผลิตสูงและยั่งยืนต่อไป

3. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของกลไกความเข้ากันได้ในยางพาราระหว่าง homograft และ heterograft โดยประเมินจากปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณลิกนิน การแสดงออกของยีนในกลุ่ม phenylpropanoid ได้แก่ ยีน *PAL* และยีน *CAD* กิจกรรมของเอนไซม์ *PAL* รวมทั้ง การศึกษาทางกายวิภาคหลังการติดตามของยางพารา

บทที่ 2 วิธีการวิจัย

วัสดุ และอุปกรณ์

1.1 ตัวอย่างพืช

การทดลองครั้งนี้ใช้ต้นตอยางพารา 3 พันธุ์ ซึ่งประกอบด้วย พันธุ์ RRIT 251, RRIM 600 และ PB 5/51 สำหรับกิ่งพันธุ์ดีที่ใช้ในการติดตอยางพารา มี 2 พันธุ์ ประกอบด้วยพันธุ์ RRIT 251 และ RRIM 600 โดยเก็บรวบรวมเมล็ดพันธุ์ และกิ่งพันธุ์มาจากแหล่งต่างๆ ตามระบุในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 พันธุ์ยางพารา และสถานที่เก็บเมล็ดพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง

	ชื่อพันธุ์	สถานที่เก็บเมล็ดพันธุ์
ต้นตอ	PB 5/51	จังหวัดตรัง
	RRIT 251	จังหวัดกระบี่
	RRIM 600	จังหวัดสุราษฎร์ธานี
กิ่งพันธุ์ดี	RRIT 251	จังหวัดสงขลา
	RRIM 600	จังหวัดสงขลา

1.2 สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์สำหรับการประเมินการพัฒนารวมประสานของรอยต่อ

ก. สารเคมีสำหรับการประเมินการพัฒนารวมประสานของรอยต่อ

(1) น้ำยารักษาสภาพ FAA II

- Ethanol
- Glacial acetic acid
- Formalin

(2) น้ำยาดังน้ำออก

- Ethanol
- Butyl alcohol
- Paraffin oil

(3) สีซาฟรานีน

- Safranin O
- Methyl cellulose
- Ethanol
- Sodium acetate

(4) สีฟาสต์กรีน

- Methyl cellulose
- Absolute ethanol
- Olive oil
- Fast green

(5) สารเคมีสำหรับการย้อมสี

- Xylene
- Absolute ethanol
- Ethanol
- สารละลาย Picric acid
- สารละลาย Ammonium hydroxide
- Clove oil
- สารละลาย Absolute ethanol : Xylene อัตราส่วน 1:1

ข. อุปกรณ์สำหรับการประเมินการพัฒนาระบบการเชื่อมประสานของรอยต่อ

- (1) เครื่องึงเนื้อเยื่อ
- (2) เครื่องโรตารีไมโครโทม
- (3) เครื่องอุ่นสไลด์
- (4) ตู้อบ
- (5) แผ่นสไลด์แก้ว
- (6) กระจกปิดสไลด์
- (7) กล้องจุลทรรศน์คอมพาวนด์
- (8) น้ำแข็ง
- (9) เครื่องแก้ว
- (10) คีมคีบ

- (11) ฟู่กัน
- (12) ตู้ดูดควัน
- (13) ไมโครเวฟ

1.3 สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์สำหรับการประเมินปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ก. สารเคมีที่ใช้ในการประเมินปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

- (1) Methanol (J.T. Baker, Canada)
- (2) Folin-Ciocaltea reaction (merck, Germany)
- (3) Sodium carbonate (Merck, Germany)
- (4) Liquid nitrogen
- (5) Gallic acid (sigma, china)
- (6) น้ำกลั่น

ข. อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการประเมินปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

- (1) โกร่งบดตัวอย่าง
- (2) หลอด Screw cap 15 มิลลิลิตร (Neptune, USA)
- (3) เครื่อง Centrifuge (Hettich, Germany)
- (4) Pipettes P20, P200, P5000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- (5) Pipettes tips (Greinerbio-one, Austria)
- (6) หลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Sorenson BioScience, USA)
- (7) ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส (Panasonic, Thailand)
- (8) เครื่อง Sonicate
- (9) Cuvette
- (10) เครื่อง Nanodrop spectrophotometer

1.4 สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์สำหรับการประเมินปริมาณลิกนิน

ก. สารเคมีที่ใช้ในการประเมินปริมาณลิกนิน

- (1) Triton X-100 (Merck, Germany)
- (2) Di-potassium hydrogen orthophosphate (Ajax finechem, Australia)
- (3) Potassium dihydrogen orthophosphate (Ajax finechem, Australia)
- (4) Sodium chloride (NaCl) (Merck Millipore, Germany)
- (5) Acetone (J.T.baker, USA)
- (6) Acetyl bromide (Sigma-Aldrich, China)
- (7) Sodium hydroxide (Loba chemie, India)
- (8) Hydroxylamine-HCl (Sigma-Aldrich, China)
- (9) Glacial acetic acid (Merck, USA)
- (10) Lignin,alkali (Sigma-Aldrich, USA)

ข. อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการประเมินปริมาณลิกนิน

- (1) โกร่งบดตัวอย่าง
- (2) หลอด Screw cap 15 มิลลิลิตร (Neptune, USA)
- (3) หลอดแก้ว Screw cap 15 มิลลิลิตร
- (4) เครื่อง Centrifuge (Hettich, Germany)
- (5) Pipettes P20, P200, P5000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- (6) Pipettes tips (Greinerbio-one, Austria)
- (7) Cuvette
- (8) เครื่อง spectrophotometer

1.5 สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์สำหรับการประเมินกิจกรรมของเอนไซม์ PAL

ก. สารเคมีที่ใช้ในการประเมินกิจกรรมของเอนไซม์

- (1) Sodium tetraborate (Ajax finechem, Australia)
- (2) Trizma ® base (Sigma-Aldrich, USA)
- (3) L-ascorbic acid (Merck, China)
- (4) β -mercaptoethanol (Bio Basic, Canada)
- (5) Triton X-100 (Merck, Germany)
- (6) Polyvinyl polypyrrolidone (PVPP) (Sigma-alorich, Ch7) Phenol, Saturated (Amresco, USA)
- (7) Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDT (Bio Basic, Canada)
- (8) Bovine Serum Albumin (Sigma-Aldrich, USA)
- (9) Tran-cinnamic acid (Sigma-Aldrich, Germany)
- (10) L-phenylalanine (Sigma-Aldrich, China)
- (11) Tris-HCl (Bio Basic, Canada)
- (12) Hydrochloric acid (Loba chemie, India)
- (13) Coomassie brilliant blue (Sigma, USA)
- (14) Liquid nitrogen

ข. อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการประเมินกิจกรรมของเอนไซม์ PAL

- (1) โกร่งบดตัวอย่าง
- (2) หลอด Screw cap 15 มิลลิลิตร (Neptune, USA)
- (3) เครื่อง Centrifuge 4 องศาเซลเซียส (Hettich, Germany)
- (4) Pipettes P20, P200, P5000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- (5) Pipettes tips (Greinerbio-one, Austria)
- (6) หลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Sorenson BioScience, USA)
- (7) ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส (Panasonic, Thailand)
- (8) เครื่อง Sonicate

- (9) Cuvette
- (10) เครื่อง Nanodrop spectrophotometer

1.6 สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์สำหรับการประเมินการแสดงออกของยีน

ก. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอ

- (1) Sodium chloride (NaCl) (Merck Millipore, Germany)
- (2) Tris-HCl (Bio Basic, Canada)
- (3) Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDT (Bio Basic, Canada)
- (4) Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Merck, Germany)
- (5) β -mercaptoethanol (Bio Basic, Canada)
- (6) Polyvinyl polypyrrolidone (PVPP) (Sigma-alorich, Ch7) Phenol, Saturated (Amresco, USA)
- (7) Liquid nitrogen
- (8) Chloroform (RCL Labscan, Thailand)
- (9) Isoamyl alcohol (J.T. Baker, USA)
- (10) Lithium chloride (LiCl) (Fisher Scientific, UK)
- (11) Absolute ethanol (J.T. Baker, USA)

ข. อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอ

- (1) โกร่งบดตัวอย่าง
- (2) หลอด Screw cap (Neptune, USA)
- (3) เครื่อง Centrifuge 4 องศาเซลเซียส (Hettich, Germany)
- (4) Pipettes P2, P20, P200, P1000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- (5) Pipettes tips (Greinerbio-one, Austria)
- (6) หลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Sorenson BioScience, USA)
- (7) ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส (Panasonic, Thailand)

(8) Gel Doc™EZ Imager (Bio-Rad, USA)

ค. สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ Complementary DNA (cDNA)

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

ง. อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการสังเคราะห์ Complementary DNA (cDNA)

- (1) เครื่องพีซีอาร์ Thermo cycle (biometra, Germany)
- (2) Pipettes P2, P20, P200, P1000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- (3) Pipettes tips (Greinerbio-one, Austria)
- (4) หลอด Microcentrifuge ขนาด 0.5 มิลลิลิตร (Sorenson BioScience, USA)
- (5) หลอดพีซีอาร์ ขนาด 200 ไมโครลิตร (Sorenson BioScience, USA)

จ. สารเคมีที่ใช้ในการทำเทคนิค qRT-PCR

- (1) SsoAdvanced™ Universal SYBR Green Supermix (Bio-Red, USA)
- (2) Diethyl pyrocarbonate (DEPC) (Panreac Application, Spain)

ฉ. อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการทำเทคนิค qRT-PCR

- (1) เครื่อง Realtime PCR
- (2) Pipettes P2, P20, P200, P1000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- (3) Pipettes tips (Greinerbio-one, Austria)
- (4) หลอด Microcentrifuge ขนาด 0.5 มิลลิลิตร (Sorenson BioScience, USA)
- (5) หลอดพีซีอาร์ ขนาด 200 ไมโครลิตร (Sorenson BioScience, USA)

วิธีการดำเนินการ

ทำการเก็บรวบรวมเมล็ดพันธุ์ยางทั้งหมด 3 พันธุ์ (ตารางที่ 1) ประกอบด้วย พันธุ์ RRIT 251 RRIM 600 และ PB 5/51 นำเมล็ดมาเพาะที่แปลงทดลองภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา สำหรับใช้เป็นต้นตอในการติดต้ายางพารา ซึ่งต้นตอที่ใช้จะมีลักษณะลำต้นตรง โคนรากไม่คดงอ และมีอายุประมาณ 6-8 เดือนหลังการเพาะเมล็ดหรือมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่น้อยกว่า 1 เซนติเมตร ติดต้ายางพาราที่ระดับความสูงจากพื้นดิน 10 เซนติเมตร โดยทำการติดต้ายางพาราเป็น 2 กลุ่ม คือ การติดต้ายางพาราบนต้นตอพันธุ์เดียวกับกิ่งพันธุ์ (homograft) ประกอบด้วยการใช้กิ่งพันธุ์ RRIT 251 และ RRIM 600 ติดตบบนต้นตอพันธุ์เดียวกัน (RRIT 251 / RRIT 251 และ RRIM 600 / RRIM 600) และการติดต้ายางพาราบนต้นตอพันธุ์ที่แตกต่างกับกิ่งพันธุ์ดี (heterograft) ประกอบด้วย การติดต้ายางพาราพันธุ์ RRIT 251 และ RRIM 600 บนต้นตอพันธุ์ PB 5/51 (RRIT 251 / PB5/51 และ RRIM 600 / PB 5/51) หลังจากติดต้ายางสำเร็จ เก็บตัวอย่างเปลือกของยางพาราบริเวณรอยเชื่อมระหว่างต้นตอกับกิ่งพันธุ์ดีหลังการติดต้ายางไปแล้ว 0 1 3 5 7 10 และ 20 วัน เพื่อใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน กิจกรรมของเอนไซม์ ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณการสะสมสารลิกนิน ภายหลังการติดต้ายาง และเก็บตัวอย่างต้นพืชบริเวณรอยเชื่อมระหว่างต้นตอกับกิ่งพันธุ์ดีหลังการติดต้ายางที่ 5 10 และ 20 วัน เพื่อใช้ศึกษาพัฒนาการของรอยเชื่อมประสาน โดยอาศัยลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา และเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตของยางพาราภายหลังการติดต้ายาง 30 วัน ซึ่งได้วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำการทดลองทั้งหมด 4 ทริตเมนต์ ทริตเมนต์ละ 3 ซ้ำ และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของทริตเมนต์แบบกลุ่มโดยใช้วิธีของดันแคน (Duncan's Multiple Range Test)

2.1 ประเมินความสำเร็จของการติดตาระหว่างต้นตอยางพาราและกิ่งพันธุ์ดี

ภายหลังการติดต้ายางที่อายุ 30 วัน ทำการประเมินความสำเร็จของการติดต้ายาง โดยสังเกตจากลักษณะของรอยแผลที่เกิดขึ้น ซึ่งต้นยางพาราที่ประสบผลสำเร็จจากการติดต้ายางแล้ว กิ่งพันธุ์จะยังคงมีสีเขียวเหมือนเดิม และอาจจะมียอดใหม่เกิดขึ้นเล็กน้อย แต่หากกิ่งพันธุ์เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลบริเวณต้ายางจะบ่งบอกว่าการติดตาระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดังกล่าวไม่ประสบผลสำเร็จ

ทำการนับจำนวนต้นของยางพาราที่ติดตาสำเร็จในแต่ละทรีตเมนต์ เปรียบเทียบกับจำนวนต้นที่ติดตาในทรีตเมนต์นั้นๆ โดยสามารถคำนวณเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จของการติดตาได้จาก

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความสำเร็จของการติดตา} = \frac{\text{จำนวนต้นที่ติดตาสำเร็จ} \times 100}{\text{จำนวนต้นที่ติดตาทั้งหมด}}$$

ต้นที่ใช้ทำการติดตาในแต่ละทรีตเมนต์ มีจำนวนไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับจำนวนต้นกล้าที่สามารถติดตาได้ในขณะที่ทำการติดตา โดยในแต่ละทรีตเมนต์จะมีจำนวนต้นกล้าที่ติดตาได้ดังต่อไปนี้ RRIT 251 / RRIT 251 มีจำนวนต้นที่ติดตาได้ 18 ต้น RRIM 600 / RRIM 600, RRIT 251 / PB5/51 และ RRIM 600 / PB 5/51 มีจำนวนต้นที่ติดตาได้ 26, 26 และ 29 ต้น ตามลำดับ

2.2 ประเมินการเจริญเติบโตภายหลังการติดตาระหว่างต้นตอยางพาราและกิ่งพันธุ์ดี

ประเมินการเจริญเติบโตภายหลังการติดตาของต้นตอยางพารา และกิ่งพันธุ์ดี โดยเริ่มบันทึกการเจริญเติบโตของยอดใหม่ภายหลังการติดตาที่อายุ 40 วัน ทำการเก็บรวบรวมข้อมูลซึ่งประกอบด้วย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของยอดใหม่ ความสูงของยอดใหม่ และจำนวนใบ ทุกๆ 20 วัน โดยในช่วง 40-90 วันหลังการติดตา จะเป็นการเจริญเติบโตของยอดใหม่ในสภาพโรงเรือน และหลังจากการติดตาไปแล้ว 90 วัน คัดเลือกต้นตอยางพาราที่มีการเจริญเติบโตที่ดีเพื่อย้ายลงแปลงปลูก และบันทึกการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง

2.3 การประเมินพัฒนาการในการเชื่อมประสานของรอยต่อระหว่างต้นตอยางพาราและกิ่งพันธุ์ดี

ทำการศึกษาพัฒนาการของรอยต่อที่อายุ 5 10 และ 20 วันหลังการติดตาของรอยต่อระหว่างต้นตอยางพารา และกิ่งพันธุ์ดี (RRIT 251 / RRIT 251, RRIM 600 / RRIM 600, RRIT 251 / PB 5/51 และ RRIM 600 / PB 5/51) สุ่มเก็บตัวอย่างทรีตเมนต์ละ 2 ต้น ทุกๆ อายุของรอยต่อ โดยตัดรอยต่อตามขวางหนา 0.5 เซนติเมตร มาเก็บรักษาในน้ำยาคงสภาพ FAA II (Formalin-acetic-alcohol) นำชิ้นส่วนพืชไปดิ่งน้ำออกนอกเซลล์ เพื่อเป็นการทำให้ชิ้นส่วนปราศจากน้ำ โดยใช้ T-butyl alcohol จากความเข้มข้นต่ำไปยังความเข้มข้นสูง นำชิ้นส่วนฝังลงในบล็อกพาราฟิน ตัดด้วยเครื่องโรตารีไมโครทอม ให้มีขนาดความหนา 12 ไมโครเมตร ติดชิ้นบางที่ตัดบนแผ่นสไลด์ จากนั้นละลายพาราฟินและเอาน้ำเข้าสู่เซลล์ นำไปย้อมสี โดยสีที่ใช้มี 2 ชนิด คือ ซาฟรานิน และฟาสต์กรีน ทำการปิดกระจกปิดสไลด์ ด้วย mounting medium และเปรียบเทียบพัฒนาการของเนื้อเยื่อบริเวณรอยต่อของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี (ละม้าย, 2552)

2.4 การประเมินปริมาณสารประกอบฟีนอลิกภายหลังการติดตามของต้นตอยางพาราและกิ่งพันธุ์ดี

เก็บตัวอย่างเปลือกของลำต้นยางพาราบริเวณที่ติดตาม 0.1 กรัม บดด้วยไนโตรเจนเหลวจนละเอียด ทำการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Shui และ Leong (2006) โดยใช้สารเมทานอล ความเข้มข้น 80% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดแก้วขนาด 15 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 9.5 มิลลิลิตร และฟอสฟอริกแอซิด 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 50 นาที (สีของสารละลายมีสีเขียวใส) เมื่อครบเวลาเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน วางหลอดในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที (สีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เปรียบเทียบกับหลอดควบคุม คือสารละลายเมทานอลความเข้มข้น 80% ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่าง ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดหาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลายกรดแกลลิก (gallic acid) ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วยมิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสด (mg/g FW)

2.5 การประเมินปริมาณลิกนินในเนื้อเยื่อพืชภายหลังการติดตามของต้นตอยางพาราและกิ่งพันธุ์ดี

นำเนื้อเยื่อของยางพาราบริเวณที่ทำการติดตามอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งตัวอย่างเนื้อเยื่อมีน้ำหนักแห้งคงที่ จากนั้นนำตัวอย่างแห้งมาบดให้ละเอียด และเติมโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (7 มิลลิลิตร, pH 7.0) ย้ายลงในหลอดไมโครเซนติฟิวซ์ขนาด 15 มิลลิลิตร ทำการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนของเหลวทิ้ง จากนั้นทำการล้างตะกอนด้วยโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (7 มิลลิลิตร, pH 7.0) 2 รอบ ไทรซอนเอ็กซ์-100 ความเข้มข้น 1% (ปริมาตรต่อปริมาตรของโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์) ที่มี pH 7.0 ปริมาตร 7 มิลลิลิตร 3 รอบ จากนั้นล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ที่มี pH 7.0 ปริมาตร 7 มิลลิลิตร 2 รอบ ล้างด้วยน้ำกลั่น 7 มิลลิลิตร 2 รอบ แล้วจึงล้างออกด้วยอะซิโตน 5 มิลลิลิตร นำตะกอนที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตะกอนแห้งที่ได้ 20 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดแก้วฟาเกลียว แล้วเติมอะซิโตนโพรไมด์ ความเข้มข้น 25% ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (ปริมาตรต่อปริมาตรของกรดอะซิติก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หลังจากนั้นย้ายลงในอ่างน้ำแข็งทันที เติมน้ำโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร และไฮดรอกซีลามีน-ไฮโดรคลอไรด์ ความ

เข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และเติมกรดอะซิติกในปริมาณที่เพียงพอต่อการสกัด ลิกนิน (5 มิลลิลิตร) แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที และนำส่วน ใสที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ค่าที่ได้จะนำไปทำการเปรียบเทียบกับกราฟ มาตรฐานของสารแอลไคล์ลิกนิน (Moreira-vilar *et al.*, 2014)

เมื่อทราบปริมาณการสะสมของลิกนิน ทำการเปรียบเทียบปริมาณลิกนินใน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ของลิกนินในสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด} = \frac{\text{ปริมาณลิกนิน} \times 100}{\text{ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด}}$$

2.6 การประเมินกิจกรรมของเอนไซม์ PAL ภายหลังการติดตาของต้นตอยางพาราและกิ่งพันธุ์ดี

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อของลำต้นยางพาราบริเวณรอยเชื่อมของต้นตอและกิ่งพันธุ์ที่ อายุ 0 3 5 7 10 และ 20 วันหลังการติดตา มาบดด้วยไนโตรเจนเหลวจนละเอียดให้ได้ 1 กรัม ใส่ลงในหลอดฝาเกลียวขนาด 15 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ 5 มิลลิลิตร และบ่มสารละลายไว้ในอ่างอัลตรา โซนิก นาน 20 นาที จากนั้นนำไปหมุนปั่นเหวี่ยง โดยใช้ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที นำส่วนใสที่ได้จากการหมุนปั่นเหวี่ยง (protein extract) มา 40 ไมโครลิตร เติมน้ำลงในหลอดแก้ว ขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเบรคฟอร์คโตรีนเจนต์ 1 มิลลิลิตร และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหา ปริมาณของโปรตีนทั้งหมด เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ โบวินเซรัมอัลบูมินที่เตรียมไว้ จากนั้นทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ PAL โดยการนำสารสกัดโปรตีน 200 ไมโครลิตร เติมน้ำลงในหลอดแก้ว ขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มี แอลพีนิล ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติมทริสไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1,300 ไมโครลิตร เขย่า ให้เข้ากัน และวางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จึงนำมาหยุด ปฏิกิริยาด้วยไฮโดรคลอไรด์ความเข้มข้น 6 นอโมลล ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นทำการวัดค่า การดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร และนำค่าที่ ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดทรานซินนามิกที่เตรียมไว้ เมื่อทราบปริมาณ โปรตีน ทั้งหมด และกิจกรรมของเอนไซม์ PAL แล้ว จึงทำการคำนวณหาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ที่ มีหน่วยเป็น mol t-cinnamic acid/hr/mg protein (Edwards and Kessmann, 1992)

2.7 การประเมินระดับการแสดงออกของยีน *PAL* และ *CAD* ภายหลังจากติดตาของต้นตอยางพารา

และกิ่งพันธุ์ดี

ก. การสกัดอาร์เอ็นเอ

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อของลำต้นยางพาราบริเวณที่ติดตา 0.1 กรัม บดด้วยไนโตรเจนเหลวจนละเอียด ใส่ในหลอดฝาเกลียวที่มีสารบัฟเฟอร์ 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารฟีนอล 1 เท่าของสารบัฟเฟอร์ บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ใส่น้ำมันเบนซีนใหม่ เติมคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอล์อัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ใส่น้ำมันเบนซีนใหม่ เติม 8 โมลาร์ ลิเทียมคลอไรด์ ปริมาตร 1/3 เท่าของส่วนใส กลับหลอดไปมาเบาๆ และนำไปตกตะกอนอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เทสารละลายด้านบนทิ้ง เติม 2 โมลาร์ ลิเทียมคลอไรด์ 1 เท่าของปริมาตรรวม นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทสารละลายด้านบนทิ้ง และเติม 100% เอทานอล 1 เท่าของปริมาตรรวม นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทสารละลายด้านบนทิ้ง ตกตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้งนาน 10-15 นาที ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำ DEPC (DEPC-treated water) ปริมาตร 100-150 ไมโครลิตร ตกตะกอนอาร์เอ็นเอซ้ำด้วย 0.1 เท่าโดยปริมาตรของ 3 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตต (pH 5.2) และ 2.5 เท่าโดยปริมาตรของ 100% เอทานอลที่แช่เย็น นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทสารละลายด้านบนทิ้ง และล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 70% เอทานอล 2 ครั้ง เทสารละลายด้านบนทิ้ง ตกตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้งนาน 10-15 นาที ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอ ด้วยน้ำ DEPC ปริมาตร 20-50 ไมโครลิตร และนำอาร์เอ็นเอที่ได้เก็บใน -20 องศาเซลเซียส

a. การเตรียม cDNA

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากเปลือกบริเวณลำต้นของยางพารา มาทำการแปลงเป็น cDNA ด้วยวิธีการของ Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA) โดยการเตรียมปฏิกิริยาในปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยอาร์เอ็นเอของเปลือกลำต้นยางพารา ความเข้มข้น 1 pg-5 µg, Oligo (dT) primer 1 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP Mix

1 ไมโครลิตร และเติมน้ำ DEPC จนมีปริมาตรครบ 15 ไมโครลิตร นำไปทำปฏิกิริยาที่ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และวางบนน้ำแข็งทันที หลังจากนั้นเติม 5X RT Buffer 4 ไมโครลิตร และ Maxima H Minus Enzyme Mix 1 ไมโครลิตร นำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เก็บ cDNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

b. การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *PAL* และยีน *CAD*

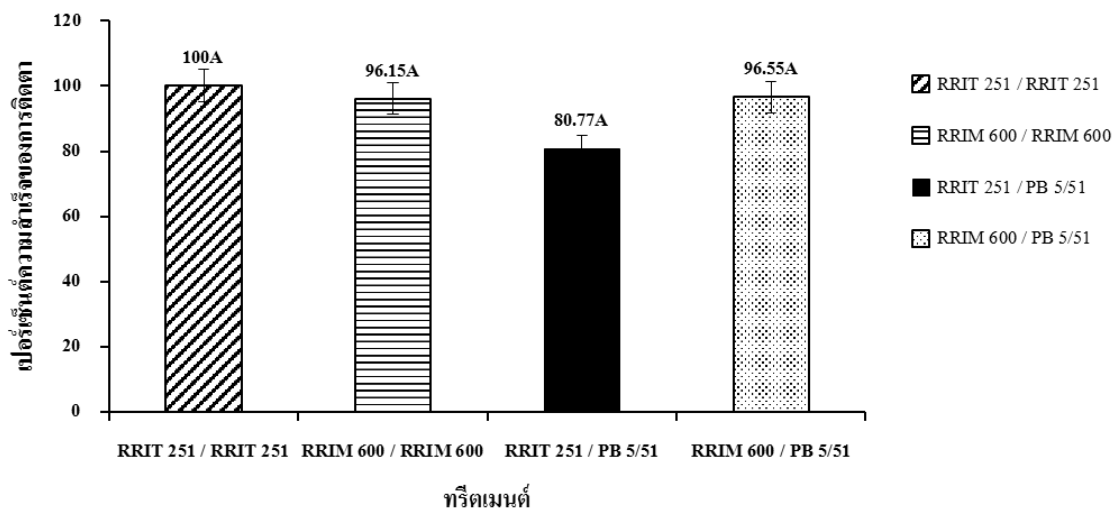
วิเคราะห์การแสดงออกของยีน โดยเทคนิค quantitative real time PCR (qPCR) โดยการนำ cDNA ที่ได้จากการสกัดเปลือกของลำต้นไปทำ real-time PCR เปรียบเทียบการ แสดง ออก ของ ยีน *PAL* (*HbPAL*-F: GGACATGCTCAAAGTTGTGG และ *HbPAL*-R: TGCTGGCATTCTTCTCATTC) และยีน *CAD* (*CADI*_F1: TGGGCAGCAAGAGACCCATC และ *CADI*_R1: ACCACTTCATGCCAGGAACC) กับ ยีน อ้างอิง คือ ยีน 18s rRNA (*18s*-F: AAGCCTACGCTCTGGATACATT และ *18s*-R: CCCGACTGTCCCTGTTAATC) ทำปฏิกิริยา Real-time PCR ด้วย SsoAdvanced™ Universal SYBR Green Supermix โดยใช้ cDNA ที่ได้จากการสกัดความเข้มข้น 80 นาโนกรัมต่อ 1 ปฏิกิริยา ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เป็นแม่แบบ และ ใช้ forward primer และ reverse primer ที่ได้จากการออกแบบในการสังเคราะห์ยีน *PAL* ของ ยางพารา และ *CAD* โดยตั้งอุณหภูมิ และกำหนดจำนวนรอบดังนี้ การแยกสายดีเอ็นเอออกจากกัน ใช้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ จำนวน 39 รอบ ได้แก่ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที นำค่า Ct ที่ได้จากการอ่านค่าของเครื่อง Real-time PCR มาวิเคราะห์ผลด้วยวิธี delta/ delta C ($\Delta\Delta C_T$ method) ตามวิธีการของ Livak และ Schmittgen (2001) เพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน โดยใช้ยีน 18s rRNA เป็นยีนอ้างอิง (พรทิพย์, 2559)

บทที่ 3

ผล

1. ความสำเร็จของการติดตาระหว่างต้นตอยางพาราและกิ่งพันธุ์ดี

จากการประเมินเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จภายหลังการติดตาขางพาราที่อายุ 30 วัน พบว่า การใช้กิ่งพันธุ์ดี RRIT 251 ติดตาบนต้นตอ RRIT 251 (RRIT 251 / RRIT 251) ให้เปอร์เซ็นต์ความสำเร็จของการติดตาสูงที่สุด คือ 100% รองลงมาคือ การใช้กิ่งพันธุ์ดี RRIM 600 ติดตาบนต้นตอ PB 5/51 (RRIM 600 / PB 5/51) และการใช้กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ติดตาบนต้นตอพันธุ์ RRIM 600 (RRIM 600 / RRIM 600) มีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จของการติดตาเท่ากับ 96.55% และ 96.15% ตามลำดับ โดยเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จของการติดตาจะน้อยที่สุดเมื่อใช้กิ่งพันธุ์ดี RRIT 251 ติดตาบนต้นตอพันธุ์ PB 5/51 (RRIT 251 / PB 5/51) คือ 80.77% (ภาพที่ 5) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการติดตาแบบ homograft จะให้อัตราการรอดชีวิตสูงกว่าแบบ heterograft ยกเว้นการใช้กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ติดตาบนต้นตอพันธุ์ RRIM 600



ภาพที่ 5 เปอร์เซ็นต์ความสำเร็จของการติดตาขางพาราที่อายุ 30 วันภายหลังการติดตา

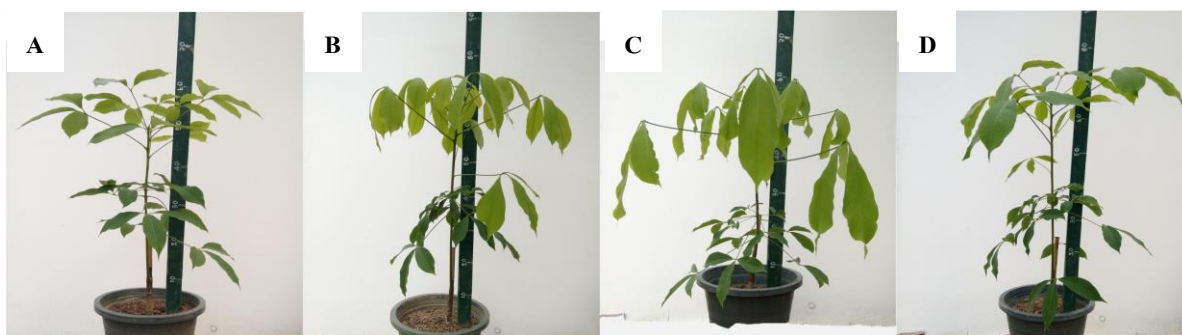
หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันหมายถึงไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบ

ค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT ที่ระดับ $P \leq 0.05$

เส้นแนวตั้งแสดงค่า standard deviation ของค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ

2. การเจริญเติบโตภายหลังการติดตาระหว่างต้นตออย่างพาราและกิ่งพันธุ์ดี

ภายหลังการติดตา 40-90 วัน ของอย่างพาราพันธุ์ RRIT 251 และ RRIM 600 บนต้นตอพันธุ์เดียวกัน และบนต้นตอพันธุ์ PB 5/51 พบว่า ยอดใหม่มีการเจริญเติบโตขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 6) ทั้งความยาวของยอด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง และจำนวนใบ โดยในทรีตเมนต์ที่ใช้กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ติดตาบนต้นตอพันธุ์ RRIM 600 (RRIM 600 / RRIM 600) มีความยาวของยอด และจำนวนใบสูงที่สุด รองลงมาคือการใช้กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ติดตาบนต้นตอพันธุ์ PB 5/51 (RRIM 600 / PB 5/51) โดยการติดตาในทรีตเมนต์ RRIM 600 / PB 5/51 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้นมากที่สุด ในขณะที่การใช้กิ่งพันธุ์ RRIT 251 ติดตาบนต้นตอพันธุ์ RRIT 251 (RRIT 251 / RRIT 251) มีความยาวของยอด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น และจำนวนใบน้อยที่สุด (ภาพที่ 8-10) จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า กิ่งพันธุ์ RRIM 600 เป็นพันธุ์ที่มีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีกว่าพันธุ์ RRIT 251 ทั้งที่เป็นการติดตาแบบ homograft (RRIT 251 / RRIT 251) และ heterograft (RRIT 251 / PB 5/51) แต่ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติกับทุกๆ ทรีตเมนต์



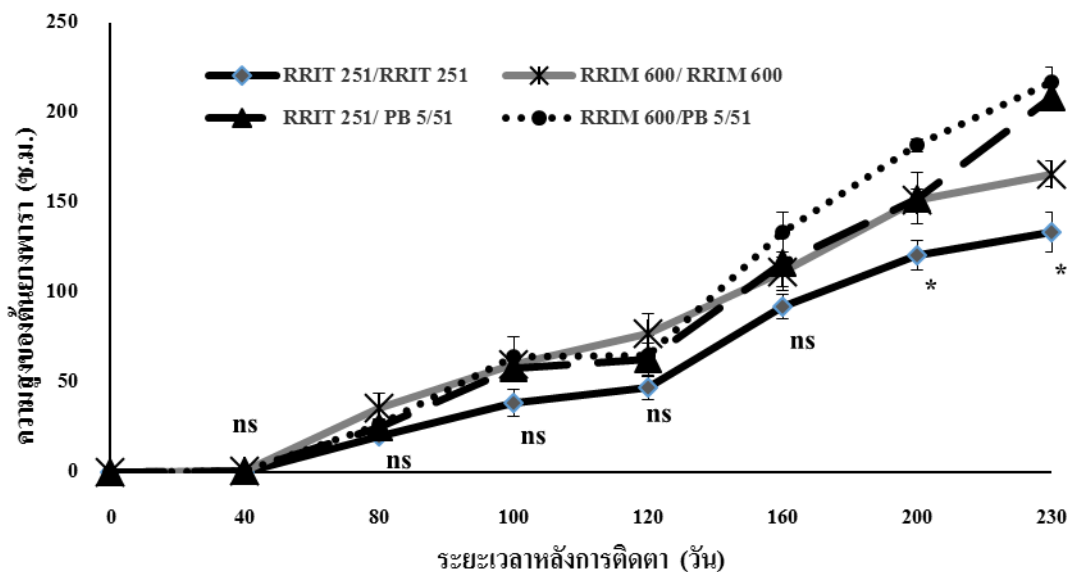
ภาพที่ 6 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของอย่างพาราภายหลังการติดตาแบบ homograft: RRIT 251 / RRIT 251 (A) และ RRIM 600 / RRIM 600 (B) และการติดตาแบบ heterograft: RRIT 251 / PB 5/51 (C) และ RRIM 600 / PB 5/51 (D) ในสภาพโรงเรือนที่อายุ 60 วันหลังการติดตา

ภายหลังการติดตา 90 วัน ทำการย้ายต้นกล้าอย่างพาราลงปลูกในแปลงปลูก เพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโต และความสามารถในการปรับตัวในแปลงปลูกของแต่ละกลุ่มพันธุ์ จากการทดลองพบว่า ยอดใหม่มีการเจริญเติบโตขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจน ทั้งความยาวของยอด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้น และจำนวนใบ โดยในทรีตเมนต์ RRIM 600 / PB 5/51 จะมีความสูง และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นมากที่สุด รองลงมาคือ RRIM 600 / RRIM 600 และ RRIT 251 / PB 5/51

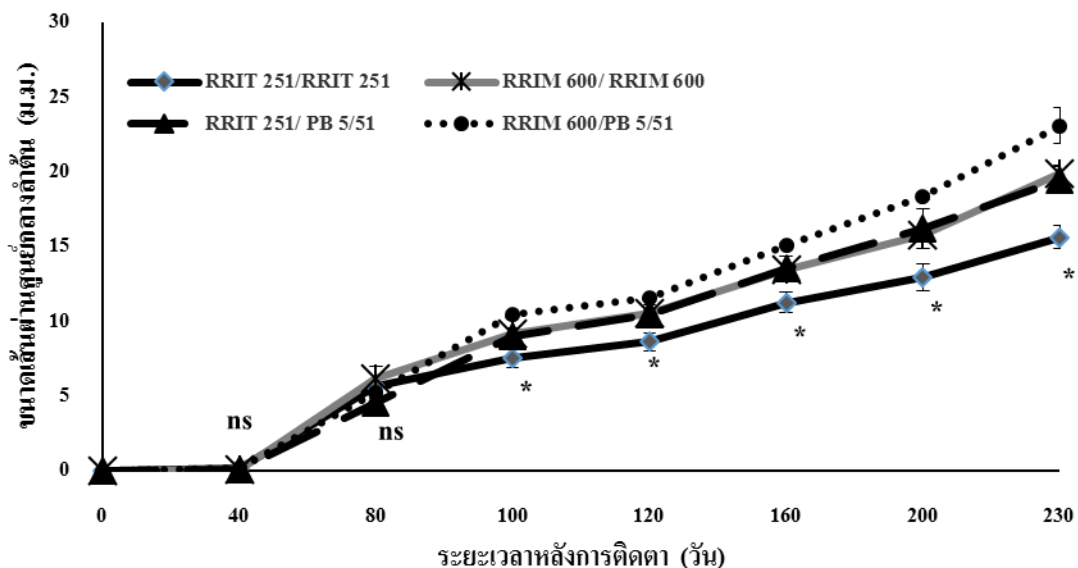
ตามลำดับ โดยพบว่าทั้ง 3 คู่พันธุ์มีการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 8-10) ในขณะที่ RRIT 251 / RRIT 251 มีการเจริญเติบโตน้อยที่สุด จากการทดลองชี้ให้เห็นว่า กิ่งพันธุ์ RRIM 600 มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่ากิ่งพันธุ์ RRIT 251 ทั้งที่เป็นการติดตามแบบ homograft และ heterograft อีกทั้งพบว่า การใช้ต้นตอยางพาราพันธุ์ PB 5/51 จะทำให้ได้ยางพาราต้นใหม่ที่มีความแข็งแรงขึ้น และสามารถจะปรับตัวกับแปลงปลูกได้เป็นอย่างดี (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของยางพาราภายหลังการติดตามแบบ homograft: RRIT 251 / RRIT251 (A) และ RRIM 600 / RRIM 600 (B) และการติดตามแบบ heterograft: RRIT 251 / PB 5/51 (C) และ RRIM 600 / PB 5/51(D) ในสภาพแปลงปลูกที่อายุ 230 วันหลังการติดตาม



ภาพที่ 8 ความยาวของยอดที่แตกใหม่ภายหลังการติดตางพาราพันธุ์ RRIT 251 และ RRIM 600 บนต้นตอพันธุ์ต่างๆ ที่อายุ 0 – 230 วัน



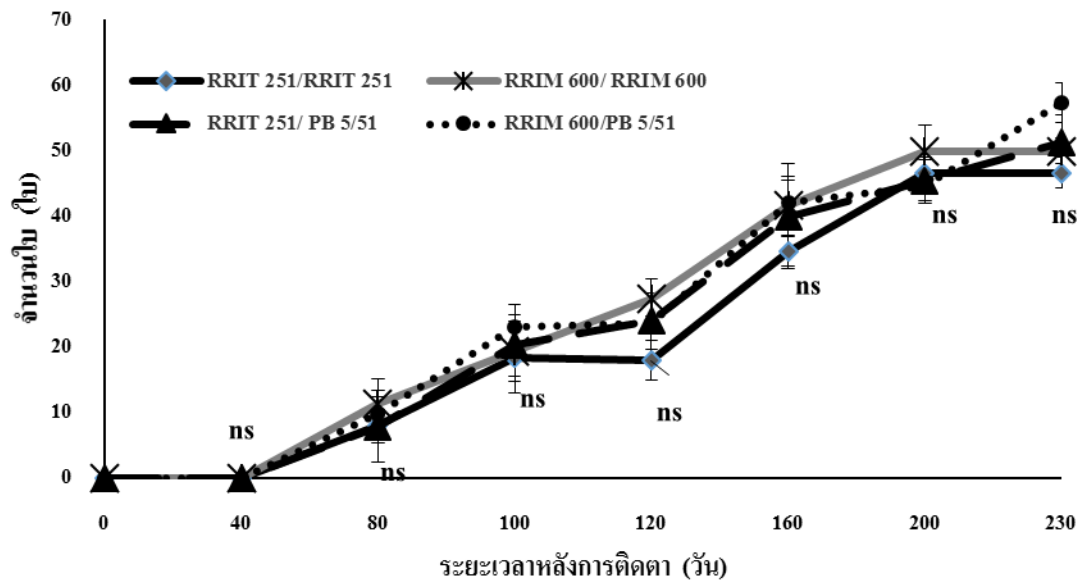
ภาพที่ 9 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของยอดที่แตกใหม่ภายหลังการติดตางพาราพันธุ์ RRIT 251 และ RRIM 600 บนต้นตอพันธุ์ต่างๆ ที่อายุ 0 – 230 วัน

หมายเหตุ : * แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ $P \leq 0.05$

จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

เส้นแนวตั้งแสดงค่า standard deviation ของค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ



ภาพที่ 10 จำนวนใบของยอดที่แตกใหม่ภายหลังการติดตาของพาราพันธุ์ RRIT 251 และ RRIM 600 บนต้นตอพันธุ์ต่างๆ ที่อายุ 0 – 230 วัน

หมายเหตุ : ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ $P \leq 0.05$

จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

เส้นแนวตั้งแสดงค่า standard deviation ของค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ

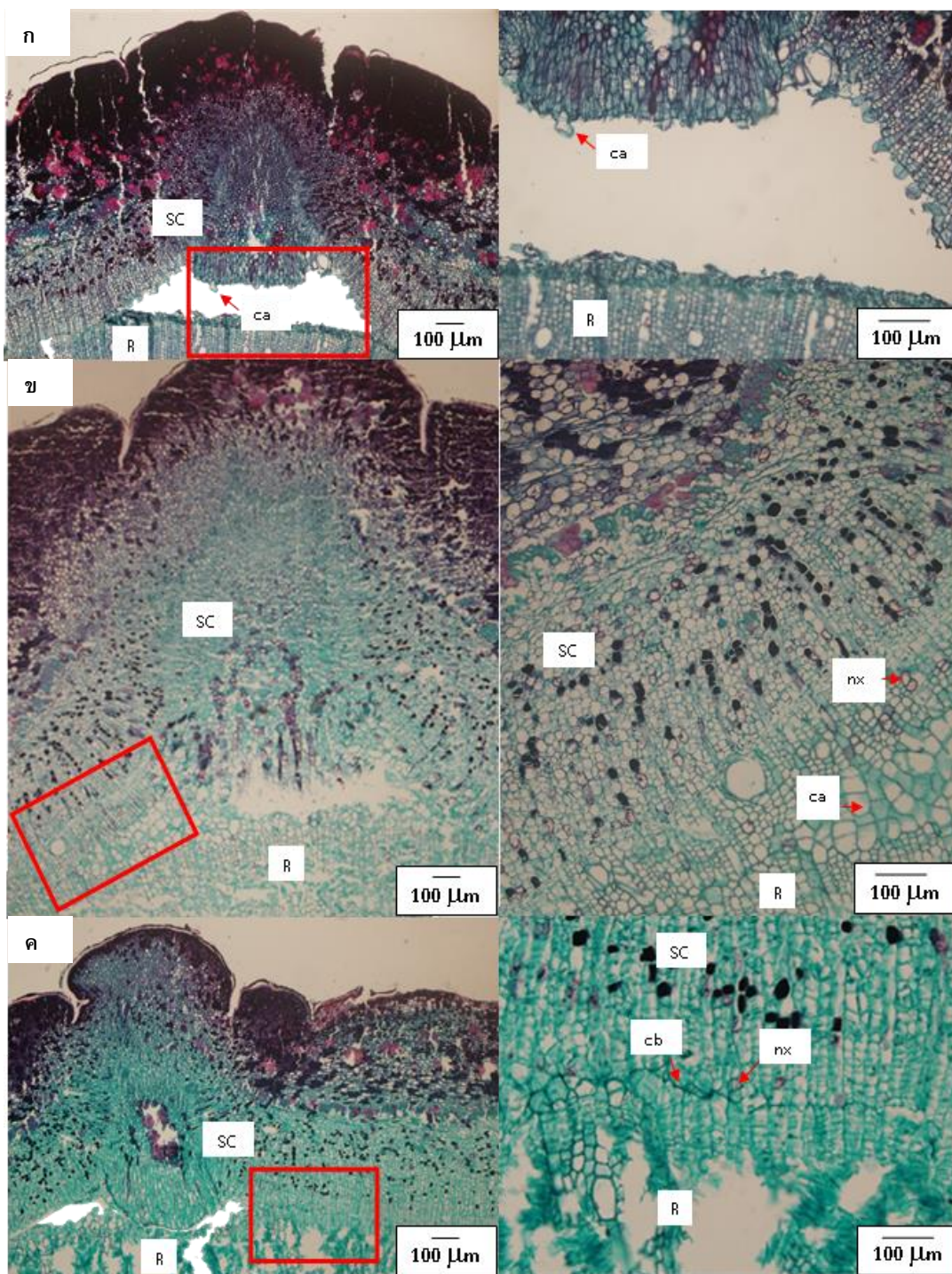
3. การเชื่อมประสานของรอยต่อระหว่างต้นตอพารา และกิ่งพันธุ์ดี

จากการศึกษาพัฒนาการของรอยต่อระหว่างกิ่งพันธุ์ดี RRIT 251 และ RRIM 600 ที่ติดบนต้นตอพันธุ์ RRIT 251, RRIM 600 และ PB 5/51 พบว่า ที่อายุ 5 วันหลังการติดตา มีการพัฒนาของเนื้อเยื่อแคลลัสตรงบริเวณรอยต่อเกิดขึ้นเล็กน้อย โดยเนื้อเยื่อแคลลัสถูกสร้างจากเนื้อเยื่อ cortex phloem และแคมเปียมที่อยู่บริเวณรอยต่อของต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี ซึ่งส่วนใหญ่แคลลัสจะเกิดจากกิ่งพันธุ์ดี และพบว่าเนื้อเยื่อแคลลัสของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีที่สร้างขึ้นในระยะแรกยังไม่เชื่อมประสานกัน เนื่องจากมีแคลลัสในปริมาณที่น้อย โดยปริมาณการสร้างแคลลัสในแต่ละคู่ของต้นตอและกิ่งพันธุ์ดีไม่มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 11A-14A)

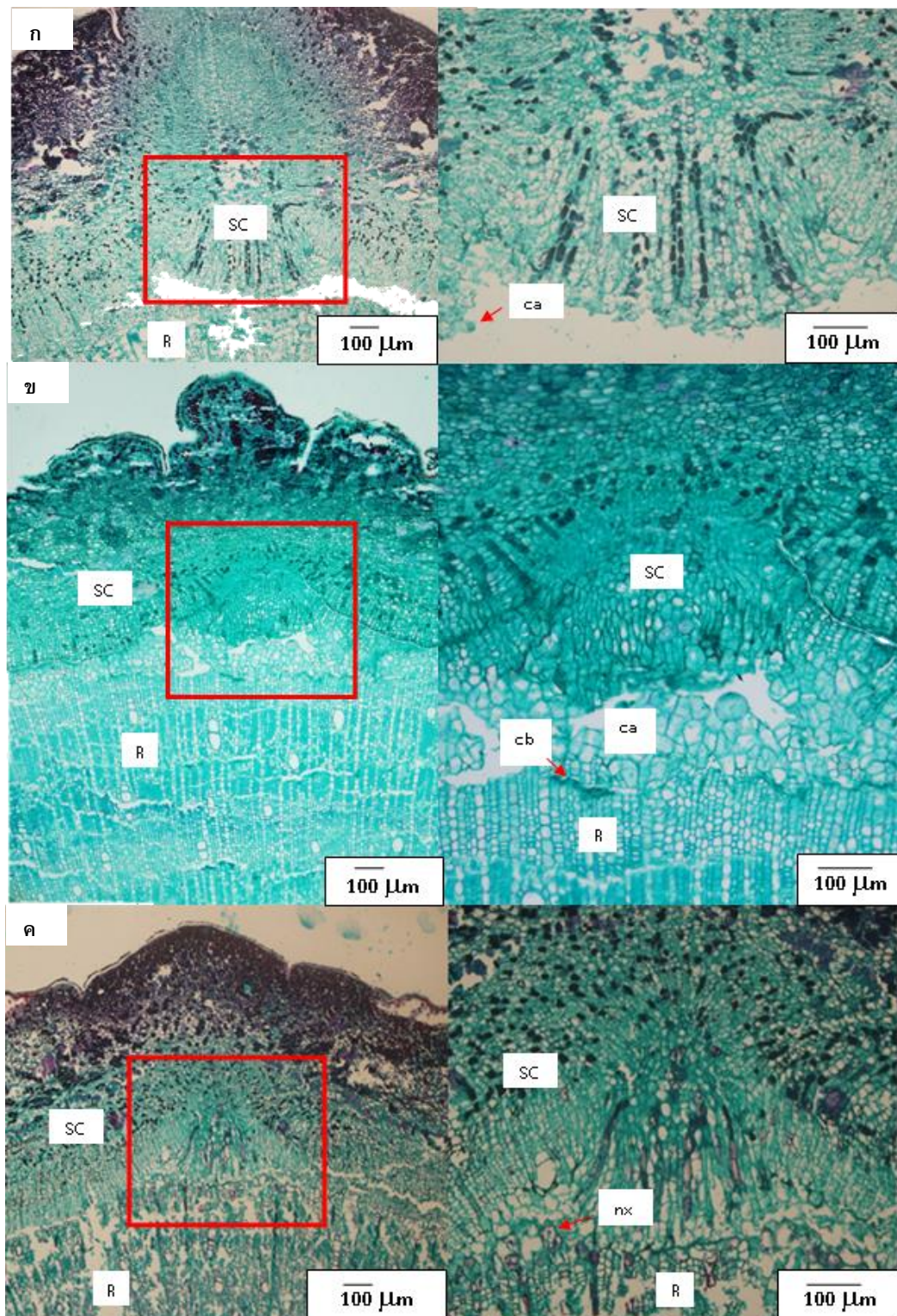
ภายหลังการติดตา 10 วันพบว่า เนื้อเยื่อแคลลัสของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีสามารถเชื่อมประสานกันได้ เนื่องจากเนื้อเยื่อแคลลัสของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว และเจริญแทรกเข้าไปในช่องว่างของบาดแผลเกิดเป็นสะพานแคลลัส ซึ่งทำหน้าที่ในการเชื่อมรอยต่อระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์เข้าด้วยกัน สามารถเห็นได้ชัดเจนระหว่างการใช้กิ่งพันธุ์

RRIT 251 ติดตามต้นตอ RRIT 251 (ภาพที่ 11B) และกิ่งพันธุ์ RRIM 600 ติดตามต้นตอ PB5/51 (ภาพที่ 14B) นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้กิ่งพันธุ์ RRIT 251 ติดตามต้นตอพันธุ์ RRIT 251 มีพัฒนาการของเนื้อเยื่อเร็วกว่าทริตเมนต์อื่นๆ สังเกตได้จากพบท่อลำเลียงน้ำใหม่เกิดขึ้น (ภาพที่ 11B) ในขณะที่การใช้กิ่งพันธุ์ RRIT 251 ติดตามต้นตอพันธุ์ PB 5/51 (ภาพที่ 13B) และการใช้กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ติดตามต้นตอพันธุ์ RRIM 600 (ภาพที่ 12B) ยังมีปริมาณของแคลลัสไม่เต็มระหว่างช่องว่างของบาดแผลที่อายุ 10 วันหลังการตัด

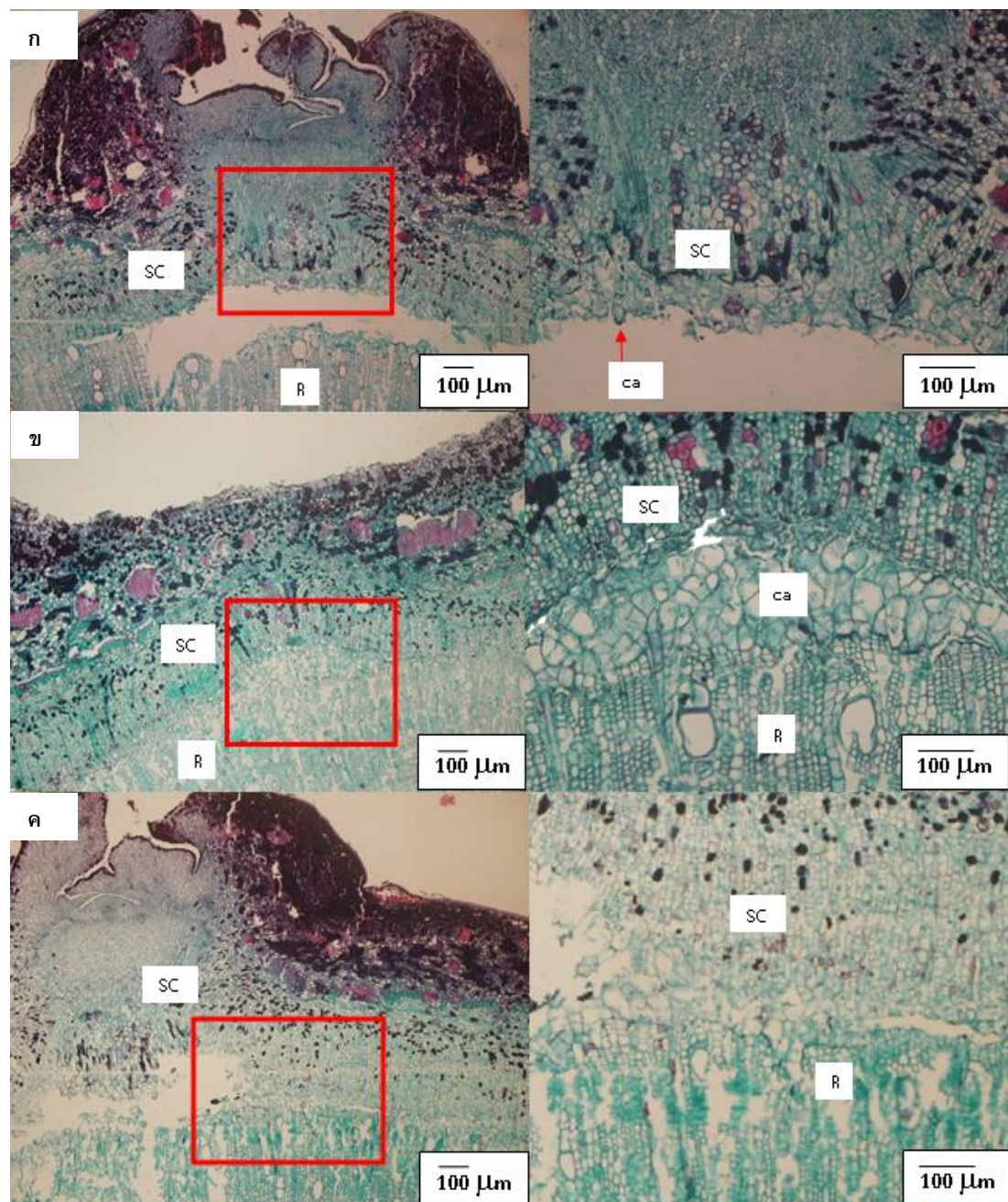
หลังจากการตัดไปแล้ว 20 วันพบว่า เนื้อเยื่อแคมเบียมใหม่ของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีเชื่อมต่อกันเกิดเป็นสะพานแคมเบียม ในระยะนี้ปรากฏเนื้อเยื่อท่อลำเลียงน้ำใหม่เพิ่มขึ้นในทริตเมนต์ที่ใช้กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ติดตามต้นตอพันธุ์ RRIM 600 (ภาพที่ 12C) และกิ่งพันธุ์ RRIM 600 ที่ติดตามต้นตอ PB 5/51 (ภาพที่ 14C) เพื่อทำหน้าที่ในการลำเลียงน้ำ แต่การพัฒนาของท่อน้ำใหม่บริเวณนี้ยังไม่สมบูรณ์ ในขณะที่การใช้กิ่งพันธุ์ RRIT 251 ติดตามต้นตอพันธุ์ PB 5/51 ยังไม่ปรากฏท่อลำเลียงน้ำใหม่ที่อายุประมาณ 30 วันหลังการตัด ดังแสดงในภาพที่ 14C



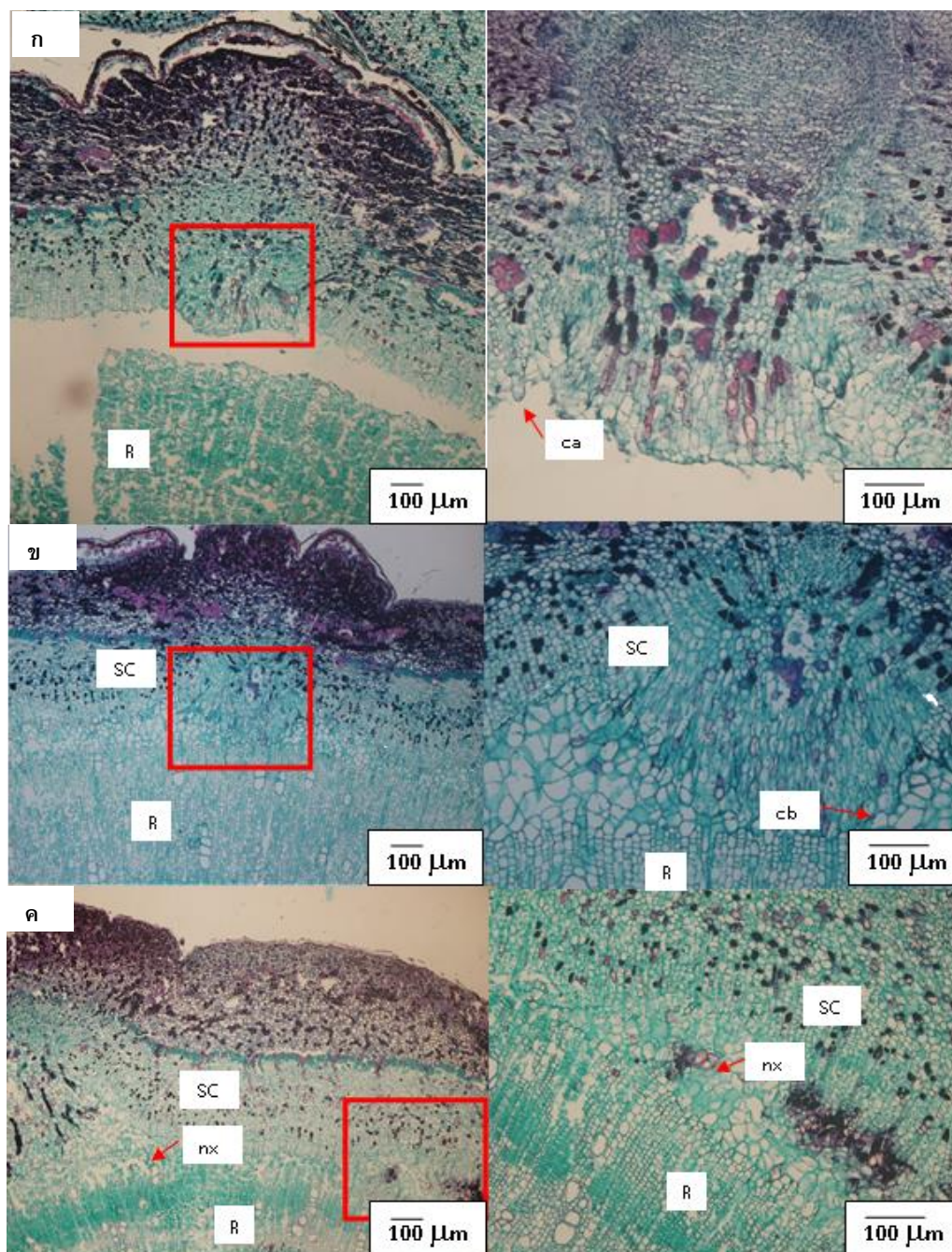
ภาพที่ 11 พัฒนาการของรอยต่อระหว่างต้นตอพันธุ์ RRIT 251 และกิ่งพันธุ์ RRIT 251 ภายหลังจากติดตาที่อายุ 5 (ก), 10 (ข) และ 20 (ค) วัน โดยภาพคอลัมน์ทางขวาเป็นภาพขยายในกรอบสี่แดงของรูปซ้ายมือ และ R: Rootstock, SC: Scion, ca: callus, nx: new xylem, cb: callus bridge



ภาพที่ 12 พัฒนาการของรอยต่อระหว่างต้นตอพันธุ์ RRIM 600 และกิ่งพันธุ์ RRIM 600 ภายหลังจากติดตาที่อายุ 5 (ก), 10 (ข) และ 20 (ค) วัน โดยภาพคอลัมน์ทางขวาเป็นภาพขยายในกรอบสีแดงของรูปซ้ายมือ และ R: Rootstock, SC: Scion, ca: callus, nx: new xylem, cb: callus bridge



ภาพที่ 13 พัฒนาการของรอยต่อระหว่างต้นตอพันธุ์ PB 5/51 และกิ่งพันธุ์ RRIT 251 ภายหลังจากติดตาที่อายุ 5 (ก), 10 (ข) และ 20 (ค) วัน โดยภาพคอลัมน์ทางขวาเป็นภาพขยายในกรอบสี่แดงของรูปซ้ายมือ และ R: Rootstock, SC: Scion, ca: callus, nx: new xylem, cb: callus bridge

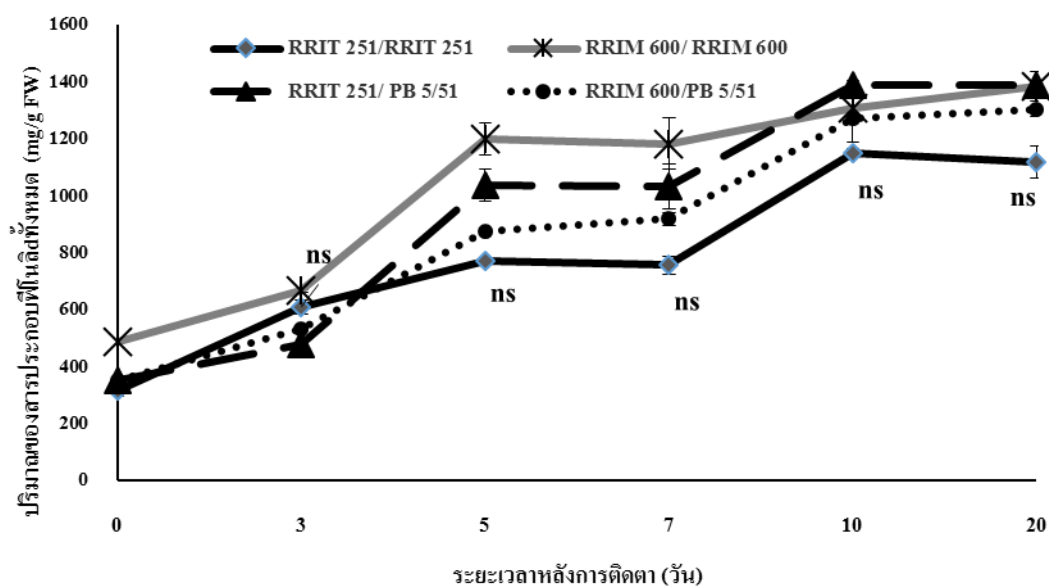


ภาพที่ 14 พัฒนาการของรอยต่อระหว่างต้นตอพันธุ์ PB 5/51 และกิ่งพันธุ์ RRIM 600 ภายหลังจากติดตาที่อายุ 5 (ก), 10 (ข) และ 20 (ค) วัน โดยภาพคอลัมน์ทางขวาเป็นภาพขยายในกรอบสีแดงของรูปซ้ายมือ และ R: Rootstock, SC: Scion, ca: callus, nx: new xylem, cb: callus bridge

4. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกภายหลังการติดตามของต้นตอยางพารา และกิ่งพันธุ์ดี

การสะสมสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

จากการประเมินปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ภายหลังการติดตามที่ระยะ 0 3 5 7 10 และ 20 วัน ของต้นตอยางพาราพันธุ์ RRIT 251 RRIM 600 และ PB 5/51 ที่ติดตามด้วยกิ่งพันธุ์ดี (RRIT 251 และ RRIM 600) พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในต้นตอที่ไม่ติดตาม (0 วันหลังการติดตาม) จะสูงที่สุดในต้นตอยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ซึ่งพบความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับต้นตอพันธุ์ RRIT 251 และ PB 5/51 จากนั้นที่ระยะ 3 วันหลังการติดตามต้นตอยางพาราทุกพันธุ์มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มสูงขึ้น โดยต้นตอพันธุ์ RRIT 251 และ PB 5/51 สร้างสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นจนอยู่ในระดับที่ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติกับต้นตอพันธุ์ RRIM 600 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการติดตามส่งผลให้ต้นตอพันธุ์ RRIT 251 และ PB 5/51 สร้างสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับต้นตอพันธุ์ RRIM 600 ที่อยู่ภายใต้สภาวะเดียวกัน และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจะเพิ่มอย่างเห็นได้ชัดที่ระยะ 5 วัน ภายหลังการติดตาม หลังจากนั้นพบว่า ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจะคงที่ และจะเพิ่มขึ้นที่ระยะ 10 วันหลังการติดตาม ทั้งนี้ที่ 5 วันหลังการติดตาม การใช้กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ติดตามบนต้นตอพันธุ์ RRIM 600 และการใช้กิ่งพันธุ์ RRIT 251 ติดตามบนต้นตอพันธุ์ PB 5/51 มีการสะสมปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าการใช้กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ติดตามบนต้นตอพันธุ์ PB 5/51 และ การใช้กิ่งพันธุ์ RRIT 251 บนต้นตอพันธุ์ RRIT 251 มีปริมาณการสะสมสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดน้อยที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 15 นอกจากนี้ยังพบว่า การติดตามแบบ heterograft ที่ประกอบด้วย การติดตามของ RRIT 251 / PB 5/51 และ RRIM 600 / PB 5/51 มีการสะสมปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเป็นไปในทางเดียวกัน แต่ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ การติดตามแบบ homograft



ภาพที่ 15 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในยางพารา ภายหลังจากการติดตามที่ระยะ 0 3 5 7 10 และ 20 วัน

หมายเหตุ : ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ $P \leq 0.05$

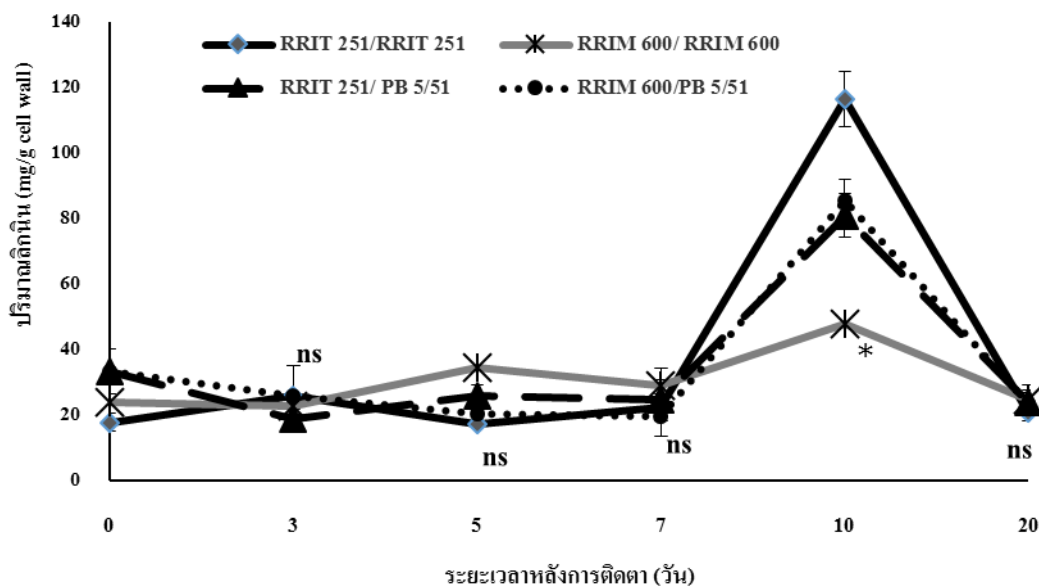
จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

เส้นแนวตั้งแสดงค่า standard deviation ของค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ

การสะสมสารลิกนินภายหลังจากติดตาม

การประเมินปริมาณการสะสมสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดภายหลังจากติดตาม นั้น หมายถึง สารประกอบฟีนอลิกทุกชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิกในกลุ่ม hydroxybenzoic acids กลุ่มฟลาโวนอยด์ กลุ่มสติลเบน (stilbenes) รวมถึงกลุ่มลิกนินด้วย ซึ่งสารในกลุ่มลิกนินมีคุณสมบัติต่อการยึดขยายตัวของเซลล์ท่อน้ำ และท่อลำเลียง ดังนั้นปริมาณลิกนินที่เกิดขึ้นภายหลังจากติดตามจะบ่งชี้ถึงความสามารถในการเชื่อมประสานกันของรอยต่อระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี จากการประเมินปริมาณสารลิกนินของต้นตอยางพาราพันธุ์ RRIT 251 RRIM 600 และ PB 5/51 ที่ติดตามด้วยกิ่งพันธุ์ดี (RRIT 251 และ RRIM 600) ภายหลังจากติดตามที่ระยะ 0 3 5 7 10 และ 20 วัน พบว่า ภายหลังจากติดตามในช่วง 0-7 วัน มีปริมาณลิกนินค่อนข้างคงที่ 20.53-24.57 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ cellwall และในทุกๆ ทริตเมนต์ปริมาณสารลิกนินจะเพิ่มสูงที่สุดภายหลังจากติดตาม 10 วัน โดยการใช้กิ่งพันธุ์ดี RRIT 251 ติดตามบนต้นตอพันธุ์ RRIT 251 (RRIT 251 / RRIT 251) จะมีการสะสมปริมาณลิกนินสูงที่สุด คือ 116.35 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ cellwall รองลงมาคือ การใช้กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ติดตามบนต้นตอพันธุ์ PB 5/51 (RRIM 600 / PB 5/51) และการใช้กิ่งพันธุ์ RRIT 251 ติดตามบน PB 5/51

(RRIT 251 / PB 5/51) ซึ่งมีการสะสมปริมาณลิกนินเท่ากับ 85.18 และ 80.73 mg.g⁻¹ cellwall ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าทั้ง 3 ทริตเมนต์มีการสะสมสารลิกนินแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ติดตามต้นต่อพันธุ์ RRIM 600 (RRIM 600 / RRIM 600) ที่มีการสะสมสารลิกนินเพียง 47.72 mg.g⁻¹ cellwall จากนั้นปริมาณลิกนินในทุกๆ ทริตเมนต์จะลดลงจนมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณลิกนิน ของต้นยางพาราที่ไม่ทำการติดตาม (0 วัน) แสดงดังภาพที่ 16



ภาพที่ 16 การสะสมของปริมาณลิกนินของยางพาราที่ 0 3 5 7 10 และ 20 วันภายหลังการติดตาม
หมายเหตุ : * แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ $P \leq 0.05$

จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

เส้นแนวตั้งแสดงค่า standard deviation ของค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ

จากข้อมูลข้างต้น สังเกตได้ว่าผลของการสะสมปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ไม่ได้เป็นตัวบ่งชี้ปริมาณลิกนินที่เกิดขึ้นหลังการติดตาม กล่าวคือแม้จะมีปริมาณการสะสมสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูง แต่ในทริตเมนต์นั้นๆ อาจแสดงค่าปริมาณลิกนินต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากในสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในแต่ละทริตเมนต์ อาจจะประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มอื่นๆ ในสัดส่วนที่มากกว่าสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่มลิกนิน ดังนั้นการเปรียบเทียบปริมาณของสารลิกนินจากปริมาณการสะสมสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด จะระบุได้ว่าทริตเมนต์ใดมีส่วนของลิกนินในสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด

จากการเปรียบเทียบปริมาณของสารลิกนินในสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าที่ 10 วันหลังการติดตามการใช้กิ่งพันธุ์ RRIT 251 ติดตามต้นตอพันธุ์ RRIT 251 มีเปอร์เซ็นต์ของสารลิกนินในสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด รองลงมาคือ การใช้กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ติดตามต้นตอ PB 5/51 การใช้กิ่งพันธุ์ RRIT 251 ติดตามต้นตอพันธุ์ PB 5/51 และการใช้กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ติดตามต้นตอพันธุ์ RRIM 600 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์ของลิกนินในสารละลายประกอบฟีนอลิกทั้งหมด หลังการติดตาม 0 3 5 7 10 และ 20 วัน

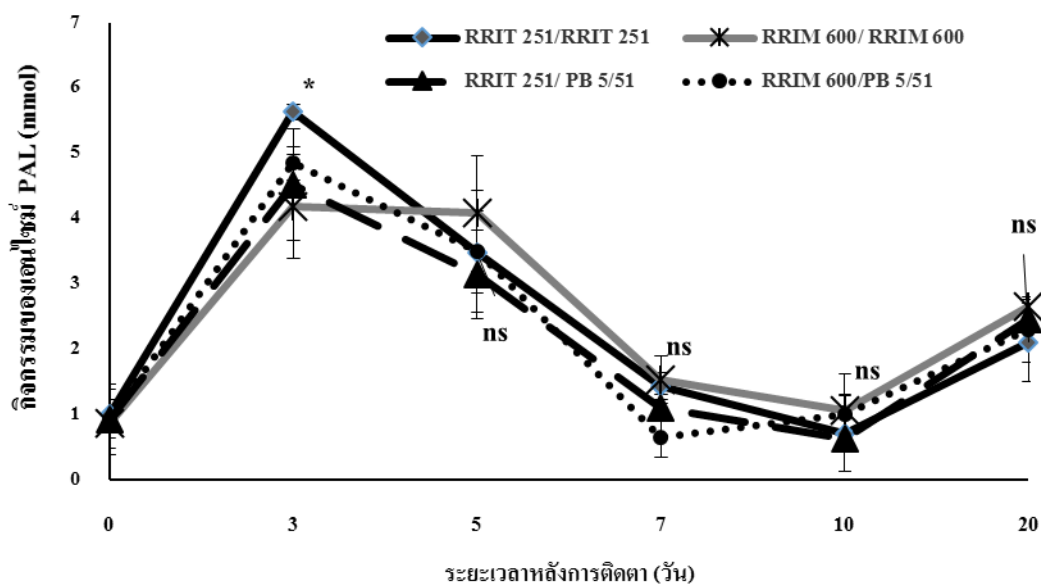
Treatment	ระยะเวลาหลังการติดตาม (วัน)					
	0	3	5	7	10	20
RRIT 251 / RRIT 251	5.54 ± 0.63a	4.19 ± 1.6a	2.20 ± 0.1a	2.92 ± 0.1a	10.12 ± 1.4a	1.83 ± 0.2a
RRIM 600 / RRIM 600	4.88 ± 3.4a	3.38 ± 2.7a	2.87 ± 0.1a	2.45 ± 0.1a	3.64 ± 0.3b	1.77 ± 0.8a
RRIT 251 / PB 5/51	9.35 ± 2.5a	3.91 ± 1.2a	2.49 ± 0.2a	2.36 ± 0.2a	5.81 ± 1.4ab	1.70 ± 0.3a
RRIT 600 / PB 5/51	9.34 ± 2.5a	4.83 ± 2.5a	2.32 ± 1.5a	2.12 ± 1.5a	6.69 ± 1.9ab	1.78 ± 0.5a

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์หมายถึงความแตกต่างทางสถิติจากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT ที่ระดับ $P \leq 0.05$
เส้นแนวตั้งแสดงค่า standard deviation ของค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ

5. กิจกรรมของเอนไซม์ PAL ภายหลังการติดตามภายหลังการติดตามของต้นตออย่างพาราและกิ่งพันธุ์ดี

เอนไซม์จะเป็นตัวทำหน้าที่ในการเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นสารประกอบชนิดต่างๆ ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกนั้น เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารตั้งต้น phenylalanine ด้วยเอนไซม์ PAL ได้เป็นสารประกอบชนิดต่างๆ เช่น cinnamic acid, coumaric acid, *p*-coumaryl coA, caffeic และ ferulic เป็นต้น ทั้งนี้การมีสารประกอบเหล่านี้ในปริมาณมากก็เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ที่มากด้วยเช่นกัน จากการประเมินกิจกรรมของเอนไซม์ PAL ภายหลังการติดตามที่ระยะ 0 3 5 7 10 และ 20 วัน ของต้นตออย่างพาราพันธุ์ RRIT 251 RRIM 600 และ PB 5/51 ที่ติดตามด้วยกิ่งพันธุ์ดี (RRIT 251 และ RRIM 600) พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ PAL ในแต่ละทริตเมนต์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ยกเว้นที่ 3 วันหลังการติดตาม ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ PAL จะเพิ่มสูงขึ้นมาก

ที่สุด โดยการใช้กิ่งพันธุ์ RRIT 251 ติดตามต้นตอพันธุ์ RRIT 251 (homograft) จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ PAL สูงที่สุด 5.0 มิลลิโมล แต่ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กิ่งพันธุ์ RRIT 251 และ RRIM 600 ติดตามต้นตอพันธุ์ PB 5/51 (heterograft) ซึ่งมีค่า 4.0 และ 4.2 มิลลิโมล ตามลำดับ ทั้งนี้หากเปรียบเทียบทั้ง 3 ทริตเมนต์กับการใช้กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ติดตามต้นตอพันธุ์ RRIM 600 กิจกรรมของเอนไซม์ PAL จะมีความแตกต่างกันทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่า มีแนวโน้มของผลการทดลองไปในทางเดียวกันในทุกๆ ทริตเมนต์ และหลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ PAL จะลดลงเรื่อยๆ จนถึงที่ระยะ 20 วันภายหลังการติดตาม เอนไซม์ PAL จะมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นอีกครั้ง แต่พบว่าการเพิ่มขึ้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ที่ 10 วันหลังการติดตาม (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 17 กิจกรรมของเอนไซม์ PAL ของยางพาราที่ 0 3 5 7 10 และ 20 วันภายหลังการติดตาม

หมายเหตุ : * แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ $P \leq 0.05$

จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

เส้นแนวตั้งแสดงค่า standard deviation ของค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ

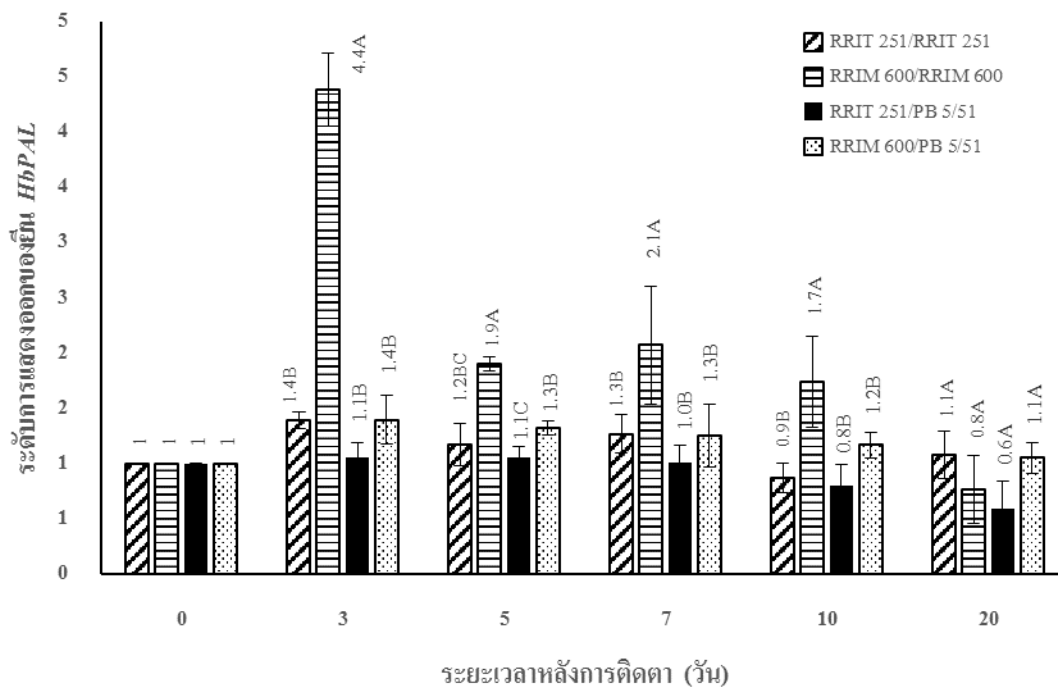
6. การแสดงออกของยีนในยางพาราภายหลังการตัดตา

การแสดงออกของยีน *PAL* ในยางพาราภายหลังการตัดตา

จากการทดลองพบว่า การแสดงออกของยีน *HbPAL* ในทุกๆ ทริตเมนต์ จะเพิ่มสูงขึ้นมากที่สุดที่ 3 วันหลังการตัดตา หลังจากนั้นจะลดระดับลงเล็กน้อย โดยที่ 3 วันหลังการตัดตา กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ที่ติดตามบนต้นพันธุ์ RRIM 600 (RRIM 600 / RRIM 600) มีการแสดงออกของยีน *HbPAL* ถึง 4.4 เท่า และสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับทริตเมนต์อื่นๆ ในขณะที่การใช้กิ่งพันธุ์ RRIT 251 ติดตามบนต้นตอ PB 5/51 (RRIT 251 / PB 5/51) มีระดับการแสดงออกของยีน *HbPAL* น้อยที่สุดคือ 1.1 เท่า แสดงดังภาพที่ 18 นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้กิ่งพันธุ์ RRIT 251 ติดตามบนต้นตอพันธุ์ RRIT 251 และการใช้กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ติดตามบนต้นตอพันธุ์ PB 5/51 มีการแสดงออกของยีน *HbPAL* ในระดับเดียวกัน โดยในช่วง 0-7 วันหลังการตัดตาพบว่ายีน *PAL* มีการแสดงออกของยีนที่มากขึ้น (up-regulation) ในทุกๆ ทริตเมนต์ แต่ภายหลังการตัดตาที่อายุ 20 วัน พบว่าในทริตเมนต์ที่ติดตามพันธุ์ RRIM 600 / RRIM 600 และ RRIT 251 / PB 5/51 จะมีการแสดงออกของยีน *HbPAL* ลดลง (down-regulation) ในขณะที่การติดตามยางพาราพันธุ์ RRIT 251 / RRIT 251 และ RRIM 600 / PB 5/51 มีการแสดงออกของยีน *PAL* ใกล้เคียงกับยางพาราที่ไม่ได้ติดตามดังแสดงในภาพที่ 18

การแสดงออกของยีน *CAD* ในยางพาราภายหลังการตัดตา

ภายหลังการตัดตาที่ระยะ 0 3 5 7 10 และ 20 วัน ของต้นตอยางพาราพันธุ์ RRIT 251 RRIM 600 และ PB 5/51 ที่ติดตามด้วยกิ่งพันธุ์ดี (RRIT 251 และ RRIM 600) จากการประเมินการแสดงออกของยีน *CAD* พบว่า การแสดงออกของยีน *CAD* ในทุกๆ ทริตเมนต์จะเพิ่มสูงขึ้นมากที่สุดที่ 7 วันหลังการตัดตา หลังจากนั้นจะลดระดับลง โดยที่ 10 วันหลังการตัดตา กิ่งพันธุ์ RRIT 251 ที่ติดตามบนต้นตอพันธุ์ RRIT 251 (RRIT 251 / RRIT 251) มีการแสดงออกของยีน *CAD* ถึง 6.2 เท่า และสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับทริตเมนต์อื่นๆ รองลงมาคือ การใช้กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ติดตามบนต้นตอ PB 5/51 และการใช้กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ติดตามบนต้นตอพันธุ์ RRIM 600 ซึ่งมีระดับการแสดงออกเท่ากับ 3.8 และ 2.6 เท่า ตามลำดับ ในขณะที่การใช้กิ่งพันธุ์ RRIT 251 ติดตามบนต้นตอ PB 5/51 (RRIT 251 / PB 5/51) มีระดับการแสดงออกของยีน *CAD* น้อยที่สุดคือ 1.2 เท่า แสดงดังภาพที่ 19

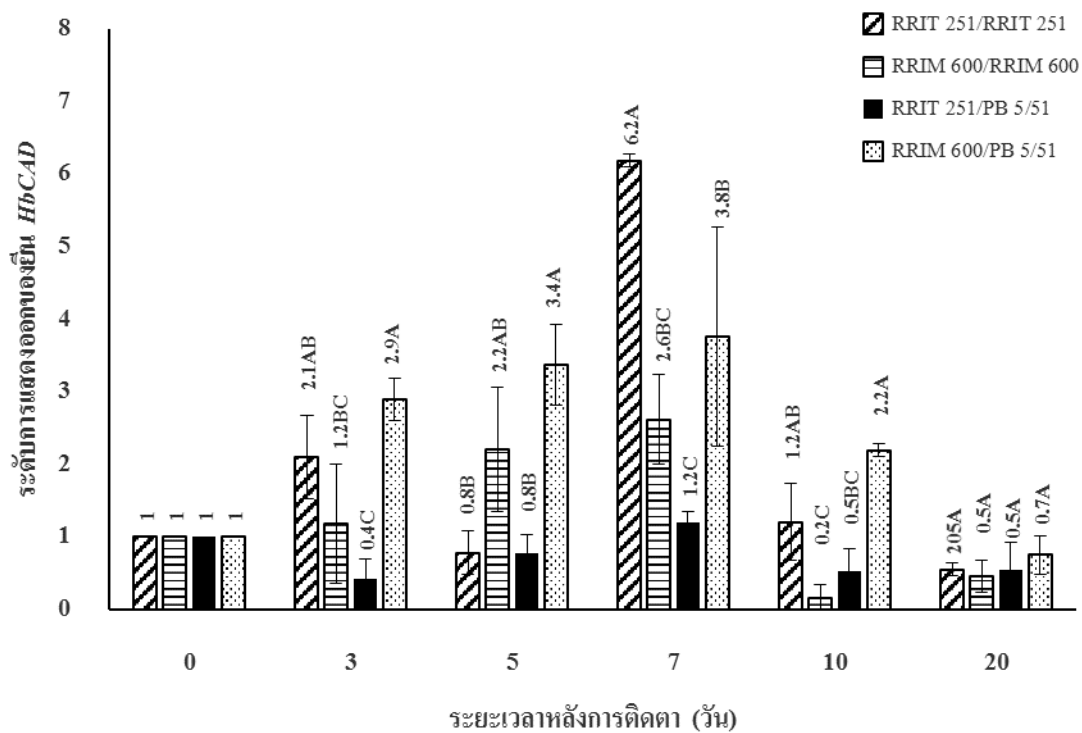


ภาพที่ 18 ระดับการแสดงออกของยีน *HbPAL* ในยางพาราภายหลังการติดเชื้อที่ระยะ 0 3 5 7 10 และ 20 วัน

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันหมายถึงไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบ

ค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT ที่ระดับ $P \leq 0.05$

เส้นแนวตั้งแสดงค่า standard deviation ของค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ



ภาพที่ 19 ระดับการแสดงออกของยีน *HbCAD* ในยางพาราภายหลังการติดเชื้อที่ระยะ 0 3 5 7 10 และ 20 วัน

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันหมายถึงไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบ

ค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT ที่ระดับ $P \leq 0.05$

เส้นแนวตั้งแสดงค่า standard deviation ของค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ

บทที่ 4

วิจารณ์

การขยายพันธุ์ยางพารา นิยมใช้การขยายพันธุ์โดยวิธีการติดตา เนื่องจากจะได้ต้นยางพาราที่ตรงตามลักษณะประจำพันธุ์ และได้ต้นยางพาราที่มีการเจริญเติบโตที่ดี ทนทานต่อสภาพแวดล้อม และสามารถให้ผลผลิตได้สูง ทั้งนี้ปัจจัยที่ส่งผลจำกัดการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของต้นยางพารานั้นมาจากหลายสาเหตุ ประกอบด้วย สภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ความชื้น และความอุดมสมบูรณ์ของดิน เป็นต้น (จรัญ, 2546) รวมถึงความแข็งแรงของต้นกล้าที่ใช้เป็นต้นตอ และความสามารถในการเข้ากันได้ระหว่างต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี ซึ่งปัญหาความเข้ากันได้นี้เกิดขึ้นกับพืชบางชนิด โดยเฉพาะในกรณีที่ต้นตอและกิ่งพันธุ์ดีมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมค่อนข้างมาก เช่น การศึกษาในส้ม (Georjou, 2000) องุ่น (Wolf and Pool, 1988; Chen *et al.*, 2017) พรุณ (Pina and Errea, 2008; Pereira *et al.*, 2014; 2017) และแพร์ (Nocito *et al.*, 2010) เป็นต้น ในกรณีของยางพารา แม้ว่าพันธุ์ที่ศึกษาทั้งหมดล้วนเป็น *Hevea brasiliensis* แต่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ ซึ่งอาจจะมีผลต่อความเข้ากันได้ของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี การติดตาทำให้พืชเกิดบาดแผลส่งผลให้ยีน PAL มีการแสดงออกที่สูงขึ้น เป็นการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ PAL ที่จำเป็นสำหรับการย่อยสารตั้งต้นในการสร้างสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด รวมถึงลิกนินซึ่งจัดเป็นสารในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกชนิดหนึ่งเช่นกัน โดยสารประกอบฟีนอลิกจะส่งผลต่อความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อพืช ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสารประกอบฟีนอลิกที่พืชสร้างขึ้นว่าเป็นกลุ่มใด หากเป็นกลุ่มฟลาโวนอยด์จะส่งผลต่อการเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อพืช แต่หากเป็นสารประกอบฟีนอลิก กลุ่มโมโนลิกนอลจะส่งผลให้เนื้อเยื่อของต้นตอและกิ่งพันธุ์ดีเชื่อมประสานกันได้ดีเนื่องจากลิกนินมีคุณสมบัติทำให้เนื้อไม้แข็งแรง และเป็นผนังเซลล์ชั้นที่สองที่มีผนังเซลล์หนา เกิดการพัฒนาของ phloem และ xylem ซึ่งเกี่ยวข้องกับหลายๆ ขบวนการพื้นฐานของการเจริญเติบโตของพืช รวมถึงการแบ่งตัวและการขยายตัวของเซลล์ (สมจินตนา และคณะ, 2551)

1. ความเข้ากันได้ระหว่างต้นตอยางพารา และกิ่งพันธุ์ดีต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษากการเข้ากันได้ของต้นตอยางพาราและกิ่งพันธุ์ดี 2 กลุ่ม คือ การติดตายางพาราบนต้นตอพันธุ์เดียวกับกิ่งพันธุ์ดี (homograft) ประกอบด้วย การใช้กิ่งพันธุ์ RRIT 251 และ RRIM 600 ติดตาบนต้นตอพันธุ์เดียวกัน และการติดตายางพาราบนต้นตอพันธุ์ที่แตกต่างกับกิ่ง

พันธุ์ดี (heterograft) ประกอบด้วย การติดตามยางพาราพันธุ์ RRIT 251 และ RRIM 600 บนต้นตอ PB 5/51 ทำการเก็บข้อมูลความสำเร็จของการติดตาม อัตราการเจริญเติบโตภายหลังการติดตาม และพัฒนาการของรอยเชื่อมประสานระหว่างต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี พบว่า การใช้กิ่งพันธุ์ RRIT 251 ติดตามบนต้นตอพันธุ์ RRIT 251 (homograft) มีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จของการติดตาม และมีพัฒนาการของรอยเชื่อมประสานระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีที่สุด แต่มีอัตราการเจริญเติบโตน้อยที่สุด อาจมีสาเหตุมาจากการเตรียมต้นตอที่ไม่สม่ำเสมอ โดยต้นตอพันธุ์ RRIT 251 มีความสมบูรณ์ของต้นกล้าที่น้อยที่สุด เนื่องจากเมล็ดพันธุ์ RRIT 251 ที่ใช้ในการเตรียมต้นกล้า มีช่วงการตกของเมล็ดช้ากว่าพันธุ์ PB 5/51 และ RRIM 600 ประมาณ 1 เดือน ส่งผลให้ต้นตอที่นำมาใช้ทดลองมีความสมบูรณ์น้อยกว่าทั้งสองพันธุ์ ซึ่งจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของยอดใหม่ สอดคล้องกับรายงานของวิทยา และคณะ (2560) ที่ทำการศึกษาคผลของอายุต้นตอต่อความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อจากการติดตามยางพันธุ์ RRIT 251 บนต้นตอพันธุ์ RRIM 600 พบว่า ต้นตอที่มีอายุมากส่งผลให้ต้นยางชำถุงมีการเจริญเติบโตดีกว่าต้นตออายุน้อย ทั้งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง และความยาวของยอดใหม่ รองลงมาคือการใช้กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ติดตามต้นตอพันธุ์ PB 5/51 (heterograft) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จของการติดตาม และพัฒนาการของรอยเชื่อมประสานที่ดี อีกทั้งมีการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับทรีตเมนต์อื่นๆ ในขณะที่การใช้กิ่งพันธุ์ RRIT 251 ติดตามบนต้นตอพันธุ์ PB 5/51 (heterograft) มีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จของการติดตามที่น้อยที่สุด และพัฒนาการของรอยเชื่อมประสานระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีที่ช้าที่สุด สังเกตจากที่ 20 วันหลังการติดตาม ไม่พบท่อลำเลียงน้ำใหม่ (new xylem) ขณะที่ทรีตเมนต์อื่นๆ สามารถพบท่อลำเลียงน้ำใหม่ได้ ทั้งนี้การติดตามกิ่งพันธุ์ RRIT 251 บนต้นตอพันธุ์ PB 5/51 มีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จของการติดตาม อัตราการเจริญเติบโต และพัฒนาการของรอยเชื่อมประสานที่ไม่แตกต่างกับการใช้กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ติดตามบนต้นตอพันธุ์ RRIM 600 (homograft) สอดคล้องกับการทดลองของ Goncalves และ Martins (2002) ที่ทำการศึกษาคผลของความสามารถในการเข้ากันได้ของต้นตอและกิ่งพันธุ์ดีในยางพารา พบว่า การใช้กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ติดตามบนต้นตอพันธุ์ RRIM 600 มีการเจริญเติบโตน้อยกว่าการใช้กิ่งพันธุ์อื่นๆ ติดตามบนต้นตอพันธุ์ RRIM 600 และพรทิพย์ (2559) รายงานว่า การติดตามกิ่งพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตอพันธุ์ RRIM 600 มีการเจริญเติบโต และการพัฒนาของกิ่งพันธุ์ดี ประกอบด้วยความสำเร็จของการติดตาม ความสูง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง และจำนวนใบของยอดที่แตกใหม่น้อยกว่าการใช้กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ติดตามบนต้นตอพันธุ์อื่นๆ แสดงให้เห็นว่ากิ่งพันธุ์ดี RRIM 600 ไม่มีปัญหาในการเข้ากันได้กับต้นตอพันธุ์อื่นๆ (รัชนิกร, 2557) จากผลการทดลองครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า การติดตามแบบ homograft และ heterograft ไม่มีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จของการติดตาม อัตราการเจริญเติบโต และพัฒนาการของรอยเชื่อมประสานระหว่างต้น

ต่อ และกิ่งพันธุ์ดี ตรงกันข้ามกับพืชชนิดอื่นที่มีรายงานเกี่ยวกับผลของต้นต่อพัฒนาการของกิ่งพันธุ์ดีที่แตกต่างกัน เช่นการทดลองในลินี่ของ Chen และคณะ (2017) พบว่าการต่อกิ่งของลินี่แบบ homograft จะมีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จของการติดตา อัตราการเจริญเติบโต และพัฒนาการของรอยเชื่อมประสานดีกว่าการติดตาแบบ heterograft ก่อนข้างชัดเจน Donald (1973) ระบุว่าความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมจะมีผลต่อความเข้ากันได้ของต้นต่อ และกิ่งพันธุ์ดี สอดคล้องกับการทดลองของ Pereira และคณะ (2014) ที่ได้ทำการศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตต่อการเข้ากันได้ระหว่างกิ่งพันธุ์ดีกับต้นตอพืชสกุล *Prunus* พบว่า การใช้ต้นตอและกิ่งพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมสูงจะให้อัตราการรอดชีวิต และอัตราการเจริญเติบโตมากกว่าต้นตอ และกิ่งพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมต่ำ Wang และคณะ (2018) ศึกษาการเสียบยอดแบบ homograft และ heterograft ระหว่างต้นแดงโมและต้นน้ำเต้าเพื่อศึกษา microRNAs ที่ตอบสนองต่อความเย็น พบว่าการเสียบยอดแบบ homograft (กิ่งพันธุ์น้ำเต้า/ต้นตอน้ำเต้า) ส่งผลให้พืชต้นใหม่มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าการเสียบยอดแบบ heterograft (กิ่งพันธุ์แดงโม/ต้นตอน้ำเต้า) แต่มีการเชื่อมประสานกันแบบ homograft บางคู่ (กิ่งพันธุ์แดงโมเสียบ/ต้นตอแดงโม) ที่ส่งผลให้พืชต้นใหม่มีการเจริญเติบโตที่น้อยกว่าการเชื่อมประสานแบบ heterograft ซึ่งกรณีนี้ให้ผลคล้ายกันกับผลการทดลองในยางพาราที่ศึกษาในครั้งนี้ พบว่า การใช้กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ติดตาบนต้นตอพันธุ์ RRIM 600 มีการเจริญเติบโตที่น้อยกว่า การเชื่อมประสานกันแบบ heterograft (RRIM 600 / PB5/51) ทั้งยังพบว่า การใช้กิ่งพันธุ์ดี RRIM 600 จะมีการเจริญเติบโตของยอดใหม่ที่ดีกว่าการใช้กิ่งพันธุ์ RRIT 251 ซึ่งให้ผลเป็นไปในทางเดียวกับการศึกษาการเชื่อมประสานกันของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีต่อการให้ผลผลิตน้ำยางและการเจริญเติบโตของยางพารา พบว่า การใช้กิ่งพันธุ์ดี RRIM 600 สามารถเข้ากันได้กับต้นตอพันธุ์อื่นๆ ส่งผลให้มีการเจริญเติบโตที่ดี (Cardinal *et al.*, 2007) อีกทั้งยังพบว่าการพัฒนาของรอยเชื่อมประสานบริเวณรอยต่อระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีครั้งนี้ มีลักษณะคล้ายคลึงกับการศึกษาความเข้ากันได้ของต้นตอยางพาราที่ทนทานต่อโรครากขาวกับกิ่งพันธุ์ RRIM 600 ของณฤทธิ (2559) รายงานว่า ภายหลังจากติดตาที่ 5 วัน เนื้อเยื่อของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี จะเริ่มสร้างเนื้อเยื่อแคลลัสขึ้นเล็กน้อย และจะเพิ่มปริมาณมากขึ้นจนเต็มหรือเกือบเต็มช่องว่างของรอยต่อที่อายุ 10 วัน หลังการติดตา ยกเว้นการใช้กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ติดตาบนต้นตอพันธุ์ RRIM 600 และการใช้กิ่งพันธุ์ RRIT 251 ติดตาบนต้นพันธุ์ PB 5/51 ที่มีปริมาณแคลลัสไม่เต็มช่องว่าง ทั้งนี้ Pina และคณะ (2012) รายงานว่าเนื้อเยื่อแคลลัสถือเป็นจุดเริ่มต้นในการเชื่อมต่อระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี ดังนั้นการมีแคลลัสเกิดขึ้นบริเวณรอยต่อระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีในปริมาณมาก จะส่งผลสำเร็จในการเชื่อมประสานรอยต่อ (Aloni *et al.*, 2010) จากนั้นจะมีการสร้างสะพานแคลลัสขึ้นมา และเริ่มสังเกตเห็นท่อลำเลียงน้ำใหม่ได้เล็กน้อยที่ 20 วันหลังการติดตา โดยการติดกิ่งพันธุ์ RRIT 251 บน

ต้นตอ PB 5/51 เป็นคู่พันธุ์เดียวที่ไม่ปรากฏต่อลำเลียงน้ำใหม่ ทั้งนี้ต่อลำเลียงน้ำใหม่ที่สร้างได้ในทุกๆ ทริตเมนต์ยังไม่มีผลของความสมบูรณ์ โดยเนื้อเยื่อแคลลัสจะพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อลำเลียงได้อย่างสมบูรณ์ที่อายุ 30 วันหลังการติดตา (จรัสศรี และคณะ, 2557)

สำหรับการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทั้งเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จของการติดตา อัตราการเจริญเติบโตของยอดใหม่ และพัฒนาการของรอยเชื่อมประสานระหว่างต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี แม้ว่าจะมีผลที่ใกล้เคียงกัน แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในหลายๆ ทริตเมนต์ เนื่องจากยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมสูง ยืนยันโดยงานวิจัยของ Lekawipat และคณะ (2003) ที่ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของยางพารา 108 พันธุ์ พบว่ายางพาราพันธุ์ RRIT 251 และพันธุ์ RRIM 600 ได้รับการจัดลำดับความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และพบว่าทั้งสองพันธุ์จัดอยู่ในกลุ่มใหญ่ซึ่งมียางพาราพันธุ์ PB 5/51 ด้วย จากเหตุผลดังกล่าวจึงไม่สามารถแยกระดับความสามารถในการติดตาของแต่ละคู่พันธุ์ได้อย่างชัดเจน การทดลองครั้งนี้บ่งชี้ว่า การติดตาของคู่พันธุ์ที่มีพัฒนาการของรอยเชื่อมประสานระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ที่ดี จะส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จของการติดตา และการเจริญเติบโตที่ดีกว่า จึงทำให้สามารถจำแนกกลุ่มตามความสามารถในการเข้ากันได้ของต้น และกิ่งพันธุ์ดีได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีความสามารถในการเข้ากันได้ดี (compatible combinations) ซึ่งประกอบด้วย การใช้กิ่งพันธุ์ RRIT 251 ติดตาบนต้นตอพันธุ์ RRIT 251 และการใช้กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ติดตาบนต้นตอพันธุ์ PB 5/51 และกลุ่มที่มีความสามารถในการเข้ากันได้น้อย (less compatible combinations) ประกอบด้วยการใช้กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ติดตาบนต้นตอพันธุ์ RRIM 600 และการใช้กิ่งพันธุ์ RRIT 251 ติดตาบนต้นตอพันธุ์ PB 5/51

2. ความเข้ากันได้ระหว่างต้นตอยางพารา และกิ่งพันธุ์ดีต่อการเปลี่ยนแปลงสารชีวเคมีในกลุ่ม phenylpropanoid

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อการเชื่อมประสานกันระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีมีหลายสาเหตุ เช่น ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่พืชสร้างขึ้นระหว่างรอยเชื่อมประสาน โดยสารประกอบฟีนอลิกถือเป็นสารชีวเคมีที่สามารถตอบสนองต่อสภาวะเครียดต่างๆ เช่น การเข้าทำลายของแมลงศัตรู รวมถึงการเกิดบาดแผล เป็นต้น (Dixon and Paiva, 1995) ซึ่งจากการทดลองพบว่า การติดตากิ่งพันธุ์ดีบนต้นตอพันธุ์ RRIT 251 RRIM 600 และ PB 5/51 พบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับการศึกษาของพรทิพย์ (2559) ที่รายงาน ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดที่เกิดขึ้นหลังการติดตากิ่งพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 บน

ต้นตอพันธุ์ต่างๆ (heterograft) รวมถึงที่ติดบนต้นตอพันธุ์เดียวกัน (homograft) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ทั้งนี้หากอธิบายตามการแบ่งกลุ่มพบว่า การติดตาในกลุ่ม less compatible combinations มีการสะสมของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากกว่าการติดตาของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ในกลุ่ม compatible combinations สอดคล้องกับผลการทดลองของ Mng'omba และคณะ (2007) ที่ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของการเสียบยอดต้น *Uapaca kirkiana* ในกลุ่ม incompatible combination ต่อการสร้างสารประกอบฟีนอลิก พบว่าการเสียบยอดของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ในกลุ่มนี้ จะมีการสะสมของสารฟีนอลิกสูง Cooman และคณะ (1996) ศึกษาใน *Eucalyptus gunnii* และรายงานว่าการกลุ่ม incompatible combinations จะมีการสะสมสารประกอบฟีนอลิก p-coumaric acid และ catechin เพิ่มสูงขึ้น และจากการศึกษาในพืช *Prunus armeniaca* พบว่าการสะสมของสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดส่งผลให้การพัฒนาของเนื้อเยื่อแคลลัสมีปัญหา การเชื่อมประสานของรอยต่อระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ไม่สมบูรณ์ (Errea et al., 1994) ซึ่งการสะสมปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในการทดลองครั้งนี้ให้ผลสอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จของการติดตา และพัฒนาการของรอยเชื่อมประสานระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี พบว่า การใช้คู่พันธุ์ในกลุ่ม less compatible combinations จะมีการสะสมปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูง ส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จในการติดตาน้อย เนื่องจากการสะสมสารประกอบฟีนอลิกจะไปยับยั้งการพัฒนาของเนื้อเยื่อแคลลัส ทั้งนี้ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่เกิดขึ้นภายหลังการติดตา จะหมายรวมถึงสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่มลิกนินด้วย Miao และคณะ (2019) รายงานว่า ลิกนินมีผลต่อกระบวนการในการรักษาบาดแผล และการสร้างแคลลัส รวมถึงการเชื่อมต่อของท่อน้ำ และท่ออาหารในพืชอีกด้วย ดังนั้นหากมีสัดส่วนของสารลิกนินในสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูง จะส่งเสริมการเชื่อมประสานของรอยต่อระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี ซึ่งผลการประเมินปริมาณลิกนินภายหลังการติดตาแสดงผลให้เห็นว่า สารลิกนินจะมีการสะสม และมีเปอร์เซ็นต์ของสารลิกนินในสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุดที่ 10 วันหลังการติดตา โดยการติดตาในกลุ่ม compatible combinations จะมีการสะสมปริมาณลิกนินมากกว่าการติดตาในกลุ่ม less compatible combinations นอกจากนี้ยังพบว่า ภายหลังจากที่มีการสะสมปริมาณลิกนินเพิ่มสูงที่สุดแล้ว หลังจากนั้นการสะสมของสารลิกนินก็จะลดลงอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกับปริมาณลิกนินของต้นยางพาราที่ไม่ทำการติดตา ซึ่งเป็นช่วงที่การประสานรอยต่อระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ เช่นเดียวกับการทดลองของ Miao และคณะ (2019) ที่ทำการประเมินปริมาณลิกนินภายหลังการเสียบยอดของแตงกวาบนต้นตอฟักทอง พบว่าปริมาณลิกนินจะเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 3 วันหลังการเสียบยอด จากนั้นปริมาณของลิกนินจะลดลงเช่นกัน จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ปริมาณการสะสมสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่มอื่นๆ ที่สูงจะส่งผลให้การสร้างลิกนินเกิดขึ้นได้น้อย สังกัดที่ 7 วันหลังการติดตา

ปริมาณการสะสมสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด ในการติดตามของกลุ่ม less compatible combinations ในขณะที่ 10 วัน หลังการติดตาม การติดตามทางพาราใน กลุ่ม less compatible combinations มีปริมาณลิกนินน้อยที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hartmann และคณะ (2002) ที่กล่าวว่า สารประกอบฟีนอลิกจะเคลื่อนย้ายจากแควิวโอล ไปยังไซโตพลาสซึม ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของกระบวนการสังเคราะห์ลิกนิน (lignin pathway) ทำให้มีการสังเคราะห์สารลิกนินได้น้อยลง โดยปริมาณลิกนินที่พืชสร้างขึ้น จะส่งผลต่อความเข้ากันได้ของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี เนื่องจากลิกนินมีคุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับขบวนการพื้นฐานของการเจริญเติบโตของพืช ทั้งการแบ่งตัว และการขยายตัวของเซลล์ สอดคล้องกับผลการทดลองข้างต้น พบว่าการติดตามทางพาราใน กลุ่ม compatible combinations ที่มีเปอร์เซ็นต์ของปริมาณลิกนินในสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูง จะมีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จของการติดตาม อัตราการเจริญเติบโต และพัฒนาการของรอยเชื่อมประสานระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ที่ดีเช่นกัน แสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกบางตัวหรือบางชนิดเท่านั้นที่ส่งผลต่อการเชื่อมประสานกันของต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี

การเพิ่มขึ้นของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกนั้น ขึ้นอยู่กับกิจกรรมของเอนไซม์ PAL ที่ได้รับการกระตุ้นจากสภาวะเครียด เช่น การเข้าทำลายของศัตรูพืช หรือการเกิดบาดแผล จากงานวิจัยของ Pereira และคณะ (2017) ที่ทำการศึกษการต่อกิ่งพืช 2 พันธุ์คือ Chimarrita และ Maciel ต่อกิ่งบนต้นตอพืชพันธุ์ Tsukuba 1 (compatible combinations) และต้นตอแอฟริคอทพันธุ์ Umezeiro (incompatible combinations) และรายงานว่า เมื่อเอนไซม์ PAL มีการทำงานในระดับที่สูงขึ้น สารประกอบฟีนอลิกซึ่งเป็นผลผลิตจากการย่อยสารตั้งต้น phenylalanine ผ่านการทำงานของเอนไซม์ PAL จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเช่นกัน โดยกิจกรรมของเอนไซม์ PAL และปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกจะสูงในกลุ่ม incompatible combinations มากกว่าในกลุ่ม compatible combinations ซึ่งรายงานตรงกับผลการทดลองของ Nocito และคณะ (2010) ที่ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยา ชีวเคมี และชีวโมเลกุลของแคลลัสแพร์ที่เกิดขึ้นจากการเชื่อมประสานกันระหว่างแคลลัสของต้นตอ และแคลลัสของกิ่งพันธุ์แพร์ และควินน์ พบว่า การเชื่อมประสานกันของแคลลัสในกลุ่ม heterograft จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ PAL และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าในกลุ่ม homograft ตรงข้ามกับการทดลองครั้งนี้ โดยจากการประเมินกิจกรรมของเอนไซม์ PAL ภายหลังจากติดตามของกิ่งพันธุ์ข้างพาราบนต้นตอพันธุ์ต่างๆ พบว่า การติดตามทางพาราในกลุ่ม compatible combinations จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ PAL สูงกว่า และมีสารประกอบฟีนอลิกต่ำกว่าการติดตามทางพาราในกลุ่ม less compatible combinations อย่างไรก็ตาม การมีกิจกรรมของเอนไซม์ PAL ในระดับสูงจะสามารถประเมินปริมาณสารประกอบฟีนอลิกได้ต่ำ เนื่องจากในการทดลองครั้งนี้ใช้การประเมินสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี folin-ciocalteu

reagent เป็นการประเมินความเข้มข้นของสารประกอบทั้งหมดที่มีหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุล (Huang *et al.*, 2005) ทั้งนี้ผลการทดลองที่ได้คล้ายกับ Prodhomme และคณะ (2019) ที่ได้ทำการประเมินกิจกรรมของเอนไซม์ และการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ภายหลังการต่อกิ่งอ่อน พบว่าการต่อกิ่งแบบ homograft มีกิจกรรมของเอนไซม์ PAL มากกว่าการต่อกิ่งแบบ heterograft ซึ่งส่งผลให้มีการสร้างสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่ม stilbene สูง ในขณะที่สร้างสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่มฟลาโวนอยด์ต่ำกว่าการต่อกิ่งแบบ heterograft นอกจากนี้ยังพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ PAL จะเพิ่มสูงขึ้นมากที่สุดที่อายุ 3 วันหลังการติดตา จากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ PAL ที่อายุ 7 และ 10 วันจะลดลงอยู่ในระดับเดียวกับต้นตอยางพาราที่ไม่ทำการติดตา และกิจกรรมของเอนไซม์ PAL จะเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งที่อายุ 20 วันหลังการติดตา อาจเป็นเพราะในช่วงเวลาดังกล่าวมีกระบวนการสังเคราะห์สารลิกนินเพิ่มขึ้น เพื่อช่วยส่งเสริมให้มีรอยเชื่อมประสานระหว่างต้นตอและกิ่งพันธุ์ที่แข็งแรงขึ้น

3. ความเข้ากันได้ระหว่างต้นตอยางพารา และกิ่งพันธุ์ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่ม phenylpropanoid

เมื่อพืชเกิดสภาวะเครียด PAL จะส่งสัญญาณควบคุมการทำงานของเอนไซม์ PAL มากขึ้น จากนั้นเอนไซม์ PAL จะทำหน้าที่ย่อยโปรตีน phenylalanine ให้เป็นสารประกอบฟีนอลิกชนิดต่างๆ เช่น cinnamic acid, *p*-coumaric acid, *p*-coumaroyl CoA, 3 malonyl CoA, chalcone, flavanone และ monolignol เป็นต้น เพื่อเป็นการป้องกันตัวเองจากสภาวะเครียด จากการประเมินระดับการแสดงออกของยีน PAL หลังการติดตาของต้นตอยางพารา และกิ่งพันธุ์ พบว่าการติดตอยางพาราในกลุ่ม less compatible combinations มีระดับการแสดงออกของยีน PAL สูงกว่าการติดตอยางพาราในกลุ่ม compatible combinations ยกเว้นการใช้กิ่งพันธุ์ RRIT 251 ติดตบบนต้นตอพันธุ์ PB 5/51 ที่จัดอยู่ในกลุ่ม less compatible combinations ซึ่งมีระดับการแสดงออกของยีน PAL น้อยกว่าการติดตอยางพาราในกลุ่ม compatible combinations สอดคล้องกับงานวิจัยของ Pina และ Errea (2008) ที่ได้ทำการประเมินระดับการแสดงออกของยีน PAL บริเวณรอยเชื่อมประสานของแคลลัสในกลุ่ม compatible combinations และกลุ่ม incompatible combinations ของพืชตระกูล *Prunus* และยังสอดคล้องกับการทดลองของ Irisarri และคณะ (2016) ที่ทำการศึกษา บทบาทที่สำคัญของยีน PAL ต่อการพัฒนารอยเชื่อมประสานในกลุ่ม incompatible combinations ของพืชตระกูล *Prunus* พบว่า การเชื่อมประสานกันของรอยต่อในกลุ่ม incompatible combinations มีระดับการแสดงออกของยีน PAL สูงกว่าการเชื่อมประสานกันของรอยต่อในกลุ่ม

compatible combinations ซึ่งระดับการแสดงออกของยีน *PAL* ในการทดลองครั้งนี้ แสดงผลไม่สอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ *PAL* ที่เกิดขึ้นหลังการติดตา ทั้งนี้อาจเกิดจากความจำเพาะของยีน *PAL* ที่ทำการศึกษา Rase และคณะ (2003) รายงานว่ายีน *PAL* ใน *Arabidopsis* มีทั้งหมด 4 ไอโซฟอร์ม คือ *PAL1*, *PAL2*, *PAL3* และ *PAL4* ซึ่งแต่ละไอโซฟอร์มจะแสดงออกในรูปแบบที่แตกต่างกัน เช่น *PAL1* ในแอปริคอตมีอิทธิพลต่อการสร้างสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และ *PAL2* มีผลต่อการสังเคราะห์สารลิกนิน (Irisari *et al.*, 2016) เป็นต้น โดยจากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAL* ที่ทำการศึกษาในการทดลองครั้งนี้ มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAL2* ในมันสำปะหลังซึ่งเป็นพืชตระกูลเดียวกับยางพารา (Euphorbiaceae) ถึง 90.3% แต่เนื่องจากยีน *PAL* ในยางพารายังไม่มีการจำแนกไอโซฟอร์มที่สามารถระบุชนิด และบทบาทหน้าที่ได้อย่างชัดเจน จึงไม่สามารถบ่งชี้ได้ว่าระดับการแสดงออกของยีน *PAL* ที่ทำการศึกษาสอดคล้องกับการสังเคราะห์สารชนิดใด แต่กิจกรรมของเอนไซม์ *PAL* เป็นการประเมินกิจกรรมของเอนไซม์ *PAL* โดยรวม ซึ่งจะประกอบด้วยกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกิดจากการควบคุมของยีน *PAL* ทุกไอโซฟอร์ม ผลการทดลองที่ได้ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาลักษณะของการเจริญเติบโต และกิจกรรมของเอนไซม์ รวมถึงการแสดงออกของยีน *PAL* จากการใช้กิ่งพันธุ์พืช Chimarrita ต่อกิ่งบนต้นตอของพืช 2 พันธุ์ คือ Capdeboscq และ Tsukuba1 เปรียบเทียบกับการต่อกิ่งพืชบนต้นตอแอปริคอตพันธุ์ Umezeiro พบว่า การใช้กิ่งพันธุ์ของพืชต่อกิ่งบนต้นตอพืช (compatible) มีระดับการแสดงออกของยีน *PAL1* และ *PAL2* รวมถึงกิจกรรมของเอนไซม์ *PAL* สูงกว่าการใช้กิ่งพันธุ์พืชต่อกิ่งบนต้นตอแอปริคอต (incompatible) อีกทั้งให้ผลของอัตราการรอดชีวิต และการเจริญเติบโต (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง พื้นที่ใบ และมวลน้ำหนักสด) ที่ดีกว่า (Pereira *et al.*, 2014) ผลคล้ายกับการทดลองครั้งนี้ คือคู่พันธุ์ในกลุ่ม compatible combinations จะมีอัตราการรอดชีวิต และการเจริญเติบโตที่สูงกว่าคู่พันธุ์ในกลุ่ม incompatible combinations

ยีน *CAD* เป็นยีนหลักในการควบคุมการสังเคราะห์สารลิกนิน ดังนั้นหากมีระดับการแสดงออกของยีน *CAD* สูงจะส่งผลให้พืชสังเคราะห์สารลิกนินได้มาก จากการทดลองพบว่า ภายหลังจากติดตาที่อายุ 7 วัน ยีน *CAD* มีระดับการแสดงออกของยีนสูงที่สุด (6.2 เท่า) และค่อยๆ ลดลงตามลำดับ ทั้งนี้การติดตายางพาราในกลุ่ม compatible combinations มีระดับการแสดงออกของยีน *CAD* มากกว่าการติดตายางพาราในกลุ่ม less compatible combinations สอดคล้องกับปริมาณสารลิกนินที่พืชสร้างขึ้นภายหลังจากติดตาโดยการติดตากลุ่ม compatible combinations ที่มีระดับการแสดงออกของยีน *CAD* สูงจะส่งผลให้มีการสร้างลิกนินได้มาก Chen และคณะ (2017) รายงานว่าการต่อกิ่งพันธุ์ดิบบนต้นตอลิ้นจี่ที่มีการแสดงออกของยีน *CAD* สูงจะมีการสังเคราะห์

ปริมาณลิกนินสูงเช่นกัน และคู่พันธุ์ในกลุ่ม compatible combinations จะมีระดับการแสดงออกของ ยีน *CAD* สูงกว่าคู่พันธุ์ในกลุ่ม incompatible combination

นอกจากนี้ระยะเวลาในการแสดงออกของยีนทั้งสองมีความสอดคล้องกับ กระบวนการของวิถี phenylpropanoid ที่มีรายงานว่ายีน *PAL* จะเป็นยีนตัวแรกที่ถูกกระตุ้นหลังจาก ที่พืชเกิดสภาวะเครียด และทำหน้าที่ในการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ *PAL* ส่งผลให้สาร phenylalanine เปลี่ยนรูปเป็นสารชนิดอื่นๆ เช่น cinnamic acid เป็นต้น โดยกระบวนการนี้เอนไซม์ *CAD* จะเป็นเอนไซม์ตัวสุดท้ายของการสังเคราะห์สารลิกนิน ซึ่งควบคุมการทำงานโดยยีน *CAD* (สายชล, 2546) จากการทดลองจึงยืนยันได้ว่ายีน *CAD* จะมีการแสดงออกของยีนช้ากว่าการ แสดงออกของยีน *PAL* ซึ่งจะใช้เวลาในการแสดงออกแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดพืช

จากการศึกษาครั้งนี้สามารถระบุความสัมพันธ์ของกลไกความเข้ากันได้ระหว่าง ต้นตอยางพารา และกิ่งพันธุ์ดีได้ว่าการเชื่อมประสานกันของรอยต่อระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีใน กลุ่ม compatible combinations จะมีระดับการแสดงออกของยีน *PAL* ต่ำกว่า มีระดับการแสดงออก ของยีน *CAD* สูงกว่า ส่งผลให้มีการสังเคราะห์สารลิกนินมากขึ้น ซึ่งเป็นผลดีต่ออัตราการรอดชีวิต พัฒนาการของรอยเชื่อมประสาน และอัตราการเจริญเติบโตภายหลังการตัดตอได้ดีกว่าเมื่อ เปรียบเทียบกับการตัดตอในกลุ่ม less compatible combinations จากการทดลองครั้งนี้ยังระบุได้ว่า กิจกรรมของเอนไซม์ *PAL* และการสะสมสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่เกิดขึ้นภายหลังการตัดตอ ไม่สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดระดับความสามารถในการเข้ากันได้ระหว่างต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี เนื่องจากผลของเอนไซม์ *PAL* ที่ทำการศึกษายังไม่สามารถระบุไอโซฟอร์มที่ชัดเจนของยีน *PAL* ใน การควบคุมการทำงานของเอนไซม์ *PAL* ที่เกิดขึ้น อีกทั้งการประเมินปริมาณการสะสม สารประกอบฟีนอลิกควรเป็นวิธีการที่สามารถระบุเฉพาะเจาะจงได้ว่าเป็นสารประกอบฟีนอลิก ชนิดใด

การใช้ต้นตอที่มีความสามารถในการทนโรค ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี และสามารถเข้ากันได้ดีกับกิ่งพันธุ์ จะทำให้ได้ต้นยางพาราที่มีความแข็งแรง และสามารถให้ ผลผลิตมากขึ้น ดังนั้นการหาต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดีที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญ ทั้งนี้การใช้ตัวชี้วัด ทางชีวเคมี จะช่วยร่นระยะเวลาในการคัดเลือกคู่พันธุ์ที่มีความเหมาะสมได้อย่างรวดเร็ว โดยจาก การทดลองครั้งนี้ พบว่าการใช้ยีน *CAD* และการสะสมปริมาณลิกนินที่เกิดขึ้นหลังการตัดตอ เป็น ตัวชี้วัดความเข้ากันได้ระหว่างต้นตอยางพารา และกิ่งพันธุ์ดี เนื่องจากยีน *CAD* เป็นยีนตัวสุดท้ายใน กระบวนการสังเคราะห์ลิกนิน โอกาสในการถอดรหัสแล้วได้เป็นสารลิกนินสูง เมื่อเปรียบเทียบกับ ยีน *PAL* ซึ่งระบุได้ไม่ชัดเจนว่า ภายหลังการถอดรหัสแล้วจะสิ้นสุดที่สารประกอบฟีนอลิกตัวใด

เพราะยังมีการเปลี่ยนแปลงรูปของสารอยู่ตลอดเวลา แต่ลิกนินเป็นสารทุติยภูมิที่ค่อนข้างมีความเสถียร และสามารถระบุได้จำเพาะว่าเป็นสารประกอบฟิโนลิกในกลุ่มลิกนิน

บทที่ 5

สรุป

จากการศึกษาความเข้ากันได้ของต้นตอของพาราและกิ่งพันธุ์ดี ระหว่างการใช้ต้นตอพันธุ์ RRIT 251 และ RRIM 600 ติดตามต้นตอพันธุ์เดียวกัน (homograft) และติดตามต้นตอพันธุ์ PB 5/51 (heterograft) ที่อายุ 0 3 5 7 10 และ 20 วันหลังการติดตา แสดงให้เห็นว่าการติดตาแบบ homograft มีอัตราการรอดชีวิต การเจริญเติบโต รวมถึงการพัฒนารอยเชื่อมประสานระหว่างต้นตอและกิ่งพันธุ์ดีได้ดีกว่าการติดตาแบบ heterograft ยกเว้นการใช้กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ติดตามต้นตอพันธุ์ RRIM 600 จึงสามารถจำแนกความเข้ากันได้ตามลักษณะสัณฐานวิทยาและเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จหลังการติดตาของแต่ละคู่พันธุ์ ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม compatible combinations ประกอบด้วย การใช้กิ่งพันธุ์ RRIT 251 ติดตามต้นตอพันธุ์ RRIT 251 และ การใช้กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ติดตามต้นตอพันธุ์ PB 5/51 และกลุ่ม less compatible combinations ประกอบด้วย การใช้กิ่งพันธุ์ RRIM 600 ติดตามต้นตอพันธุ์ RRIM 600 และ การใช้กิ่งพันธุ์ RRIT 251 ติดตามต้นตอพันธุ์ PB 5/51

การติดตามในกลุ่ม compatible combination จะมีระดับการแสดงออกของยีน *PAL* ต่ำ และมีระดับการแสดงออกของยีน *CAD* สูง ส่งผลให้มีการสังเคราะห์ลิกนินเพิ่มขึ้น ส่งเสริมต่อการสร้างเนื้อเยื่อแคลลัส และเป็นสาเหตุให้รอยเชื่อมประสานระหว่างต้นตอและกิ่งพันธุ์มีพัฒนาการที่ดี จึงมีอัตราการรอดชีวิตภายหลังการติดตา และมีการเจริญเติบโตที่ดี

การติดตามของคู่พันธุ์ในกลุ่ม less compatible combination จะมีระดับการแสดงออกของยีน *PAL* สูง และมีการแสดงออกของยีน *CAD* ต่ำ ส่งผลให้การสะสมของสารลิกนินที่ต่ำ ซึ่งเป็นการยับยั้งการสร้างเนื้อเยื่อแคลลัส ทำให้ระยะเวลาในการเชื่อมประสานกันของต้นตอและกิ่งพันธุ์ช้าลง การพัฒนาเนื้อเยื่อท่อลำเลียงน้ำ จึงมีอัตราการรอดชีวิตภายหลังการติดตา และมีการเจริญเติบโตที่น้อยลง

เอกสารอ้างอิง

- กรมพัฒนาที่ดิน. 2548. เอกสารวิชาการยางพารา กรมพัฒนาที่ดิน. กรุงเทพฯ: ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.
- กษมา เริงฉลาด. 2555. การคัดเลือกพันธุ์ยางพาราที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นต้นตอและการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- กุหลาบ คงทอง และประสาน ลีบสุข. 2548. การวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีน *cinnamyl-alcohol dehydrogenase (CAD)* ในยางพันธุ์เพื่อเนื้อไม้ ละเชิงเทรา. ปทุมธานี: รายงานการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร.
- จรัญ ไชยสร. 2546. การขยายพันธุ์พืช. นครศรีธรรมราช: คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล.
- จรัสศรี นวลศรี, กรกช นาคคณอง และณัฐภากร อะซิม. 2559. การศึกษากลไกของยีนต้านทานโรครากขาวในยางพารา. รายงานการวิจัยคณะกรรมการธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- จรัสศรี นวลศรี, อิมรอม ยีดำ, สายันห์ สดุดี และรัชนิกร แก้วจุลกาญจน์. 2557. การศึกษาอิทธิพลของต้นตอยางพาราพันธุ์พื้นเมืองที่ต้านทานโรครากขาวกับกิ่งตายางพันธุ์ดี. สงขลา: รายงานการวิจัยคณะกรรมการธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- จริงแท้ ศิริพานิช. 2549. ชีวิตวิทยาหลังการเก็บเกี่ยวและการวางของพืช. นครปฐม: ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน.
- จรินทร์ การะนัด, สุนทร แก้วนวลศรี และนิพนธ์ บรรจงกิจ. 2540. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างต้นตอกับตาของยางบางพันธุ์. กรุงเทพฯ: รายงานการวิจัยยางพารา สถาบันวิจัยยางพารา กรมวิชาการเกษตร.
- จันทิมา นามโชติ. 2556. ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบกิ่งมะขวิดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์.
- ชนนิษฐ์ ชูพยัคฆ์, กำไร วรนุช, รัตติกานต์ บัวเรือง และอนุพันธ์ กงบังเกิด. 2556. การเปรียบเทียบการสกัดอาร์เอ็นเอสามวิธีเพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-qPCR จากพืชวงศ์พริกไทย. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 41: 1030-1042.

- ณฤทธิ์ คชรัตน์. 2559. ศึกษาการเข้ากันได้ของต้นตอของพาราที่ทนต่อโรครากขาวกับพันธุ์ RRIM 600. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- เทียมใจ ตลดูยาทร. 2523. กายวิภาคของพฤษภ. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 424.
- นันทิยา วรธนะภุติ. 2542. การขยายพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ไอเอสพรีนติ้งเฮาส์.
- พรทิพย์ แสงศิลป์. 2559. ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *Phenylalanine ammonia lyase (PAL)* และสารประกอบฟีนอลิกต่อความสามารถในการเข้ากันได้ของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ยางพาราต่างๆ. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- รัชนิกร แก้วจุลกาญจน์. 2557. การวิเคราะห์พันธุกรรมของยางพาราพันธุ์พื้นเมืองโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอฟดี และการศึกษาอิทธิพลของต้นตอพื้นเมืองต่อการเจริญเติบโตของกิ่งพันธุ์ RRIM 600. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ละม้าย ทองบุญ. 2552. เทคนิคพื้นฐานทางเนื้อเยื่อวิทยา. สงขลา: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ลือชัย บุตุคป. 2554. สารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ทางชีวภาพ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม 31: 443-455.
- วัชร อัดถพิพพหลคุณ และมนตรี อัดถพิพพหลคุณ. 2536. Inverse PCR. ทฤษฎีและการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR technology. กรุงเทพฯ: คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล หน้า 84.
- วิทยา พรหมมี, กฤษดา สังข์สิงห์ และธีระพงษ์ โทหนูสิน. 2560. อิทธิพลต้นตอต่อความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อจากการติดต่อกับต้นตอขนาดเล็ก. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มประจำปี 2560 สถาบันวิจัยยาง การยางแห่งประเทศไทย.
- วิศิษฐ์ศรี โดศุภกุลวรรณ. 2556. การพัฒนาทปฏิบัติการโดยใช้วิธีการจัดการเรียนรู้แบบสร้างความรู้ด้วยตัวเอง เรื่อง โครงสร้างและหน้าที่ของพืชดอก สำหรับผู้เรียนในระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย. ปรินญาณิพนธ์ การศึกษามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- ศุภมิตร ลิ้มพิชัย. 2554. ปลุกยางด้วยต้นติดตายอ่อน. กลีกรไต้ร่มยางพารา. หนังสือพิมพ์กสิกร หน้า 38.
- สถาบันวิจัยยาง. 2559. คำแนะนำพันธุ์ยาง. วารสารยางพารา 37: 2-41.
- สมจินตนา รูเดอร์แมน, พนิดา คงสวัสดิ์วรกุล, อัญชिरา สุขมาก และเพยาว์ ร่มรื่นสุขารมย์. 2551. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับขบวนการสร้างเนื้อไม้ยางพารา. รายงานผลการวิจัย สถาบันวิจัยยาง การยางแห่งประเทศไทย.

- สายชล เกตุษา และอภิธา บุญศิริ. การเปลี่ยนแปลงสารฟีนอลิก ลิกนิน และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเปลือกผลมังคุดหลังการตกกระทบ. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สายทอง แก้วฉาย. 2556. โรครากขาวของยางพาราและการกำจัด. วารสารมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ 5: 118-131.
- สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ กรมวิชาการเกษตร. 2545. ฐานข้อมูลเชื้อพันธุ์กรรมพืช: ยางพารา. กรุงเทพฯ: ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2559. สถิติการเกษตรของประเทศไทยปี 2559. เอกสารวิชาการ กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- สุริรัตน์ ปัญญาโตนะ ทวนทวี และเมืองทอง ทวนทวี. 2532. ขยายพันธุ์พืช. ขยายพันธุ์พืชโดยรูปภาพ ฉบับปรับปรุงใหม่. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ท้าวฮั่น.
- อุไรวรรณ ขุนจันทร์ เขมมิการ์ โคมพัตร กิตติยา เอกเชวง และนันทา เจริญเชาว์. 2560. การชักนำการแสดงออกของยีน *PR-I* และกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส การสะสมของกรดซาลิไซลิกและสคอพอลิตินในยางพาราหลังการปลูกเชื้อ *Phytophthora palmivora*. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย 9: 1-13.
- Ahmahd, B. 1999. Effect of rootstock on growth and water use efficiency of *Hevea* during water stress. *Journal of Rubber Research* 2: 99-119.
- Aloni, B., R. Cohen, L. Karni, H. Aktas, and M. Edelstein. 2010. Hormonal signaling in rootstock–scion interactions. *Scientia Horticulture* 27:119–126.
- Aydiushko, S. A., X. S. Ye and J. Kuc. 1993. Detection of several enzymatic activities in leaf prints cucumber plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 42: 441-454.
- Buchloh, G. 1960. The lignification in stock-scion junctions and its relation to compatibility. *Phenolics in Plant Health and Disease* 4: 67-71.
- Cardinal, A. B. B., P. S. Gonçalves and A. L. M. Martins. 2007. Stock-scion interaction on growth and rubber yield of *Hevea brasiliensis*. *Scientia Agricola* 64: 235-240.
- Chabannes, M., K. Ruel, A. Yoshinaga, B. Chabbert, A. Jauneau, J. P. Joseleau and A. M. Boudet. 2001. *In situ* analysis of lignins in transgenic tobacco reveals a differential impact of individual transformations on the spatial patterns of lignin deposition at the cellular and subcellular levels. *Plant Journal* 28: 271-82.

- Chen, Z., J. Zhao, F. Hu, Y. Qin, X. Wang and G. Hu. 2017. Transcriptome changes between compatible and incompatible graft combination of *Litchi chinensis* by digital gene expression profile. *Scientific Reports* 7: 1-12.
- Cooman, L. D., E. Everaet, P. Curir and M. Dolci. 1996. The possible role of phenolic compound in incompatibility expression in *Eucalyptus gunnii* micrograft. *Phytochemical Analysis* 7: 92-96.
- Darikova, J. A., Y. V. Savva, E. A. Vaganov, A. M. Grachev and G. V. Kuznetsova. 2011. Grafts of woody plants and the problem of incompatibility between scion and rootstock. *Biology* 4: 54-63.
- Dixon, R. A. and N. L. Paiva. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1085-1097.
- Dixon, R. A., L. Achnine, P. Kota, C. Liu, M. S. S. Reddy and L. Wang. 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* 3: 371-390.
- Donald, L. 1973. Inheritance of graft compatibility in Douglas-fir. *Botanical Gazette* 134: 49-52.
- Edwards, R. and H. Kessmann. 1992. Isoflavonoid phytoalexins and their biosynthetic enzymes. *In Molecular Plant Pathology: A Practical Approach* eds Gurr S, McPherson M, Bowles D Oxford University Press, Oxford Vol.2: 45-62.
- Errea, P., A. Felipe and M. Herrero. 1994. Graft establishment between compatible and incompatible *Prunus spp.* *Journal of Experimental Botany* 54: 393-401.
- Errea, P. 1998. Implications of phenolic compounds in graft incompatibility in fruit tree species. *Scientia Horticulturae* 74: 195-205.
- Fernandez- Garcia, N., M. Carvajal and E. Olmos. 2004. Graft union formation in tomato plants: peroxidase and catalase involvement. *Annals of Botany* 93: 53 – 60.
- Georgiou, A. 2000. Performance of 'Nova' mandarin on eleven rootstocks in Cyprus. *Scientia Horticulturae* 84: 115-126.
- Goncalves, P. S. and A. L. M. Martins. 2002. Combination ability effects of clonal rootstock and scion in rubber trees (*Hevea*). *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 2: 445-452.
- Hahlbrock, K. and D. Scheel. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Molecular Biology* 40: 347-369.

- Hartmann, H. T., D. E. Kester, F. T. Davies and R. L. Geneve. 2002. Plant Propagation. Principles and Practices (7th ed). Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, USA. 849 pp.
- Hoffmann, L., S. Maury, F. Martz, P. Geoffroy and M. Legrand. 2003. Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 278: 95-103.
- Huang, D., B. Ou and R.L., Prior. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1841-1856.
- Irisarri, P., T. Zhebentyayeva, P. Errea and A. Pina. 2016. Differential expression of *phenylalanine ammonia lyase (PAL)* genes implies distinct roles in development of graft incompatibility symptoms in *Prunus*. *Scientia Horticulturae* 204: 16-24.
- Lekawipat, N., K. Teerawatanasuk, M. Rodier-Goud, M. Seguin, A. Vanavichit, T. Toojinda and S. Tragoonrung. 2003. Genetic diversity analysis of wild germplasm and cultivated clones *Hevea brasiliensis* Muell Arg. by using microsatellite markers. *Rubber Research* 6: 36-4.
- Li, H. 2002. Isolation and characterization of phenylalanine ammonia-lyase and ACC oxidase genes in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) (Doctoral dissertation). University of Bath.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25: 402-408.
- Miao, L., S. Li, L. Bai, A. Anwar, Y. Li, C. He and X. Yu. 2019. Effect of grafting methods on physiological change of graft union formation in cucumber grafted onto bottle gourd rootstock. *Scientia Horticulturae* 244: 246-259.
- Mng'omba, S. A. and E. S. D. Toit. 2007. Histological evaluation of early graft compatibility in *Uapaca kirkiana* Muell Arg. Scion/Stock combinations. *American Society for Horticultural Science* 42: 732-736.
- Moreira-vilar, F.C., R. D. C. Siqueira-Soares, A. Finger-Teixeira, D. M. D. Oliveira, A. P. Ferro, G. J. D. Rocha, M. D. L. Ferrarese, W. D. D. Santos and O. Ferrarese-Filho. 2014. The acetyl bromide method is faster, simpler and presents best recovery of lignin in different herbaceous tissues than klason and thioglycolic acid methods. *PLoS ONE* 9: e1 10000.

- Nocito, F. F., L. Espen, C. Fedeli, C. Lancilli, S. Musacchi, S. Serra, S. Sansavini, M. Cocucci and G. A. Sacchi. 2010. Oxidative stress and senescence-like status of pear calli co-cultured on suspensions of incompatible quince microcalli. *Tree Physiology* 30: 450-458.
- Pereira, I. S., A. Pina, L. E. C. Antunes, A. D. Campos and J. C. Fachinello. 2017. Genotypic differences in cyanogenic glycosides levels of compatible *Prunus persica* *P. persica* and incompatible *P. persica* *P. mume* combinations. *Bragantia* 7: 1-12.
- Pereira, I. S., L. E. C. Antunes, R. D. S. Massias, A. D. Campos, P. Errea, J. C. Fachinello and A. Pina. 2014. Growth characteristics and phenylalanine ammonia-lyase activity in peach grafted on different *Prunus* spp. *Biologia Plantarum* 58: 114-120.
- Pina, A. and P. Errea. 2008. Differential induction of phenylalanine ammonia-lyase gene expression in response to *in vitro* callus unions of *Prunus* spp. *Journal of Plant Physiology* 165: 705-714.
- Pina, A., P. Errea, and H. J. Martens. 2012. Graft union formation and cell-to-cell communication via plasmodesmata in compatible and incompatible stem unions of *Prunus* spp. *Scientia Horticulturae* 143:144-150.
- Prodhomme, D., J. V. Fonayet, C. Hévin, C. Franc, G. Hilbert, G. Reve, T. Richard, N. Ollat and S. J. Cookson. 2019. Metabolite profiling during graft union formation reveals the reprogramming of primary metabolism and the induction of stilbene synthesis at the graft interface in grapevine. *BMC Plant Biology* 19: 599.
- Raes, J., A. Rohde, J. H. Christensen, Y. V. Peer and W. Boerjan. 2003. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133: 1051–1071.
- Sánchez-Sánchez, H. and A. Morquecho-Contreras. 2017. Chemical plant defense against herbivores. *Herbivores*. DOI: 10.5772/67346
- Shui, G. and L. P. Leong. 2006. Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. *Food Chemistry* 97: 277-284.
- Sobhana, P., J. Gopalakrishnan, J. Jacob, and M. R. Sethuraj. 2001. Physiological and biological aspects of stock-scion interaction in *Hevea brasiliensis*. *Indian Journal of Natural Rubber Research* 14: 131-136.

- Wang, L., X. Wu, G. Li, D. Qin, Tao, Y and P. Xu. 2018. Generating homo and heterografts between watermelon and bottle gourd for the study of cold-responsive microRNAs. *Journal of Visualized Experiments* 141:1-8.
- Whetten, R. W. and R. Sederoff. 1995. Lignin biosynthesis. *The Plant Cell* 7: 1001-1013.
- Wolf, T. K. and R. M. Pool. 1988. Effects of rootstock and nitrogen fertilization on the growth and yield of Chardonnay grapevines in New York. *American Journal of Enology and Viticul* 39: 29-33.
- Yeh, S. Y., F. C. Huang, T. Hoffmann, M. Mayershofer and W. Schwab. 2014. FaPOD27 functions in the metabolism of polyphenols in strawberry fruit (*Fragaria* sp.). *Frontiers in Plant Science* 5: 1-18.

ภาคผนวก

สารเคมีที่ใช้ในการตัดเนื้อเยื่อพืช

1. น้ำยาคงสภาพเนื้อเยื่อพืช FAA II (Formalin Acetic Acid)

- 70% Ethanol	90.0	มิลลิลิตร
- Glacial acetic acid	5.0	มิลลิลิตร
- Formalin	5.0	มิลลิลิตร

น้ำยาคงสภาพเนื้อเยื่อพืช FAA II เป็นที่นิยมมากกว่าน้ำยาชนิดอื่น เพราะสามารถ
ใช้ได้ดีสำหรับการศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างทั้งภายใน และภายนอก สามารถแช่ชิ้นส่วนไว้ในน้ำยา
ชนิดนี้ได้ยาวนานโดยไม่จำกัดเวลา และไม่ทำอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืช

2. สี Safranin

- Safranin O	2.0	กรัม
- Methyl cellusolve	100.0	มิลลิลิตร
- 90% Ethanol	50.0	มิลลิลิตร
- Sodium acetate	2.0	กรัม
- Formalin	4.0	กรัม

3. สี Fast green

- Methyl cellusolve	100.0	มิลลิลิตร
- Absolute ethanol	100.0	มิลลิลิตร
- Cove oil	100.0	มิลลิลิตร
- Fast green	1.5	กรัม

ตารางภาคผนวกที่ 1 สูตรน้ำยาดังน้ำออกจากเซลล์พืช 12 ลำดับ

ลำดับที่	ส่วนผสม	ปริมาณ
1	Water	95.0 มิลลิลิตร
	95% Ethanol	5.0 มิลลิลิตร
	Butyl alcohol	0 มิลลิลิตร
2	Water	90.0 มิลลิลิตร
	95% Ethanol	10.0 มิลลิลิตร
	Butyl alcohol	0 มิลลิลิตร
3	Water	80.0 มิลลิลิตร
	95% Ethanol	20.0 มิลลิลิตร
	Butyl alcohol	0 มิลลิลิตร
4	Water	70.0 มิลลิลิตร
	95% Ethanol	30.0 มิลลิลิตร
	Butyl alcohol	0 มิลลิลิตร
5	Water	50.0 มิลลิลิตร
	95% Ethanol	40.0 มิลลิลิตร
	Butyl alcohol	10.0 มิลลิลิตร
6	Water	30.0 มิลลิลิตร
	95% Ethanol	50.0 มิลลิลิตร
	Butyl alcohol	20.0 มิลลิลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ) สูตรน้ำยาดังน้ำออกจากเซลล์พืช 12 ลำดับ

ลำดับที่	ส่วนผสม	ปริมาณ
7	Water	15.0 มิลลิลิตร
	95% Ethanol	50.0 มิลลิลิตร
	Butyl alcohol	35.0 มิลลิลิตร
8	Water	5.0 มิลลิลิตร
	95% Ethanol	40.0 มิลลิลิตร
	Butyl alcohol	55.0 มิลลิลิตร
9	Water	0.0 มิลลิลิตร
	95% Ethanol	25.0 มิลลิลิตร
	Butyl alcohol	75.0 มิลลิลิตร
10	Pure butyl alcohol + eosin	
11	Pure butyl alcohol	
12	Butyl alcohol	50.0 มิลลิลิตร
	Paraffin oil	50.0 มิลลิลิตร

หมายเหตุ: หากใช้น้ำยารักษาสภาพ FAA II ในการเก็บรักษาชิ้นส่วนตัวอย่าง ให้เริ่มการดั่งน้ำออกจากเนื้อเยื่อพืชจากน้ำยาลำดับที่ 6 เพราะในน้ำยารักษาสภาพ FAA II ประกอบด้วย 70% Ethanol ซึ่งตรงกับแอลกอฮอล์ของน้ำยาลำดับที่ 6 ที่มีส่วนผสมเป็น 70% alcohol

ตารางภาคผนวกที่ 2 ขั้นตอนการเตรียมชิ้นส่วนพืชจนเป็นบล็อกพาราฟิน

ขั้นตอนที่	รายละเอียด	หมายเหตุ
1	เก็บตัวอย่างพืช	
2	Fixation 12-24 ชั่วโมง	การคงสภาพ
3	น้ำยาลำดับที่ 6 : 2 ชั่วโมง น้ำยาลำดับที่ 7 : 2 ชั่วโมง น้ำยาลำดับที่ 8 : 2 ชั่วโมง น้ำยาลำดับที่ 9 : 2 ชั่วโมง น้ำยาลำดับที่ 10 : 2 ชั่วโมง น้ำยาลำดับที่ 11 : 2 ชั่วโมง น้ำยาลำดับที่ 12 : 2 ชั่วโมง	การดึงน้ำออกจากเซลล์พืช
4	พาราฟินแข็ง + น้ำยาลำดับที่ 12 + ตัวอย่างชิ้นส่วนพืช : 2 ชั่วโมง พาราฟินแข็งเหลว 2 + ตัวอย่างชิ้นส่วน พืช : 2 ชั่วโมง พาราฟินแข็งเหลว 3 + ตัวอย่างชิ้นส่วน พืช : 2 ชั่วโมง พาราฟินแข็งเหลว 4 + ตัวอย่างชิ้นส่วน พืช : 2 ชั่วโมง	การแทรกซึม
5	ฝังชิ้นส่วนพืชลงในบล็อกพาราฟิน	

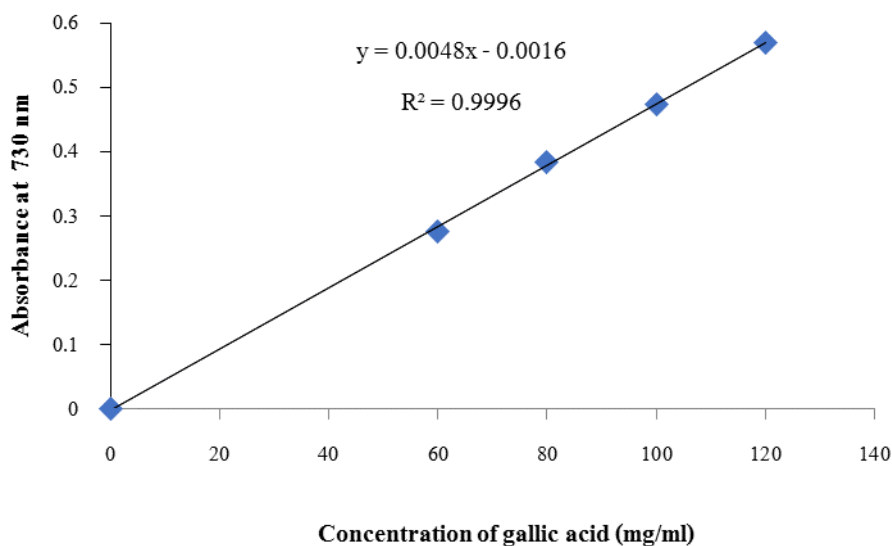
ตารางภาคผนวกที่ 3 ขั้นตอนการย้อมสีเนื้อเยื่อพืช

ขั้นตอน	สาร	ปริมาณ
Deparaffinization	Xylene	2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
	Absolute ethanol : Xylene	2 นาที
	Absolute ethanol	2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
Hydration	95% Ethanol	2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
	70% Ethanol	2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
	50% Ethanol	2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
Staining	Tap water	2 นาที
	Safranin	15 นาที
	Tap water	2 นาที
Dehydration	Picric acid in 95% ethanol	5 - 10 วินาที
	Ammonium hydroxide in 95% ethanol	10 วินาที – 1 นาที
	95% Ethanol	2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
	Absolute ethanol	2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
Staining	Use clove oil fast green	1 - 2 วินาที
	Fast green	10 วินาที – 15 วินาที
	Use clove oil fast green	1 - 2 วินาที
	New clove oil	
Clearing	Absolute ethanol : Xylene	2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
	Xylene	2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
Mounting	Mounting medium	

การประเมินปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

- เตรียมสารละลาย gallic acid ที่ความเข้มข้น 0, 60, 80, 100 และ 120 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายสาร gallic acid ด้วยเมทานอล ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์
- นำสารละลาย gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นละ 2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร
- เติม Folin-Ciocalteu reagent 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 80% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
- ตั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 50 นาที (สีของสารละลายมีสีเขียวใส) เมื่อครบเวลาเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน วางหลอดในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที (สีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน)
- วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์



ภาพภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิกสำหรับคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การประเมินปริมาณสารลิกนิน

1. การเตรียม 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0) 1,000 มิลลิลิตร

a. 1 M Potassium phosphate anhydrous (K_2HPO_4)

M.W.= 174.18 g/mol : 500 มิลลิลิตร

- Potassium phosphate anhydrous (K_2HPO_4) 87.09 กรัม
- น้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

b. 1 M Potassium dihydrogen phosphate (KH_2HPO_4)

M.W.= 136.09 g/mol : 500 มิลลิลิตร

- Potassium dihydrogen phosphate (KH_2HPO_4) 68.04 กรัม
- น้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

2. การเตรียม 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) 1,000 มิลลิลิตร

- 0.1 M potassium phosphate buffer 500 มิลลิลิตร
- น้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

3. การเตรียม 1% Triton X-100 50 มิลลิลิตร

- Triton X-100 0.5 มิลลิลิตร
- 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) 49.5 มิลลิลิตร

4. การเตรียม 1 M Sodium chloride 50 มิลลิลิตร

- Sodium chloride 2.92 กรัม
- 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) 50 มิลลิลิตร

5. การเตรียม 25% acetyl bromide 25 มิลลิลิตร

- Acetyl bromide 6.25 มิลลิลิตร
- Glacial acetic acid 18.75 มิลลิลิตร

6. การเตรียม 2 M Sodium hydroxide 30 มิลลิลิตร

- Sodium hydroxide 2.4 กรัม
- น้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร

7. การเตรียม 5 M hydroxylamine-HCl 20 มิลลิลิตร

- hydroxylamine-HCl 6.95 กรัม
- น้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร

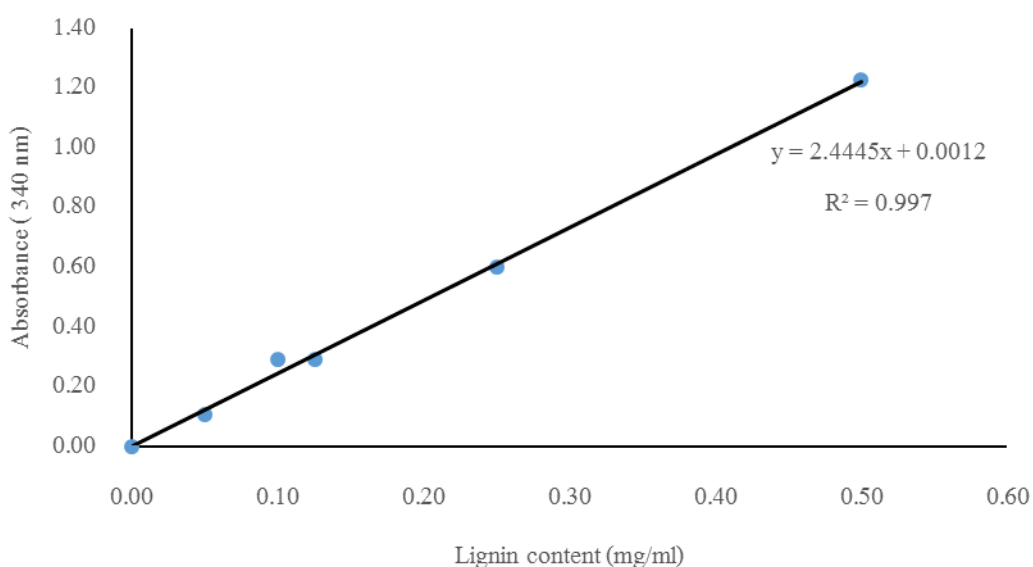
8. การเตรียมกราฟมาตรฐานของ Lignin, alkali ซึ่งมีค่า $d = 1.3 \text{ g/ml}$

a. เตรียม stock solution ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสาร lignin, alkali 0.312 กรัม ละลายใน 2% sodium hydroxide

b. ทำ serial dilution ที่ความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.1, 0.05 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

- c. ผสมกับตัวทำละลาย
- | | |
|-----------------------|---------------|
| 2 M NaOH | 0.9 มิลลิลิตร |
| 5 M Hydroxylamine-HCl | 0.1 มิลลิลิตร |
| Glacial acetic acid | 5.0 มิลลิลิตร |

d. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร



ภาพภาคผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานของสารละลาย lignin, alkali สำหรับคำนวณปริมาณลิกนิน

การประเมินกิจกรรมของเอนไซม์ PAL

1. การเตรียม Extraction buffer	100	มิลลิลิตร
- 0.1% Triton X-100	0.1	มิลลิลิตร
- 0.05 M sodium borate	1.91	กรัม
- 0.05 M ascorbic acid	0.88	กรัม
- 1% β -mercaptoethanol	1.0	มิลลิลิตร
- 0.1% Tris-base	1.21	กรัม
- 2% Polyvinyl polypyrrolidone	2.0	กรัม
- 1 mM Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt	0.037	กรัม

ละลายในน้ำ 80 มิลลิลิตร หลังจากทีสารละลายเข้ากันและไม่มีตะกอน ทำการปรับปริมาตรของสารละลายให้ได้ 100 มิลลิลิตร

2. การเตรียมสารละลาย Bradford reagent

- 0.01% Coomassie brilliant blue	0.1	กรัม
- 4.7% Ethanol	100	มิลลิลิตร
- 8.5% Phosphoric acid (จาก 85% Phosphoric acid)	100	มิลลิลิตร

ละลายสาร Coomassie brilliant blue ลงในสารเอทานอล ให้สมบูรณ์ จากนั้นเติมสาร Phosphoric acid ผสมให้เข้ากัน

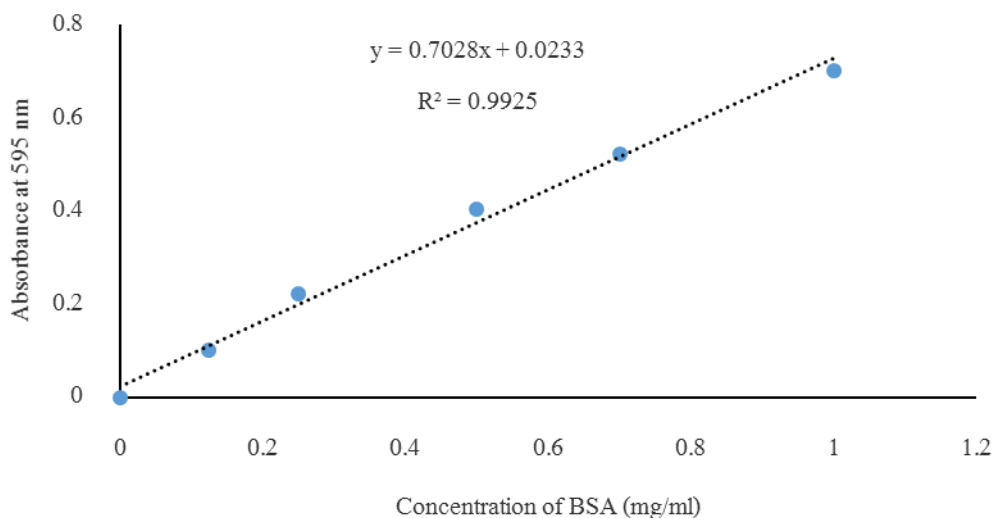
3. เตรียมกราฟมาตรฐานของโปรตีน

a. เตรียม stock solution ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสาร Bovine Serum Albumin (BSA) 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

b. ทำ serial dilution ที่ความเข้มข้น 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

c. นำสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นละ 40 ไมโครลิตร ผสมกับ Bradford reagent 1 มิลลิลิตร

d. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร



ภาพภาคผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐานสำหรับคำนวณปริมาณโปรตีน

4. การเตรียมสารสำหรับประเมินกิจกรรมของเอนไซม์ PAL

- a. 0.1 M Tris-HCl 60 มิลลิลิตร
 - Tris-base 1.0 กรัม
 - น้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร

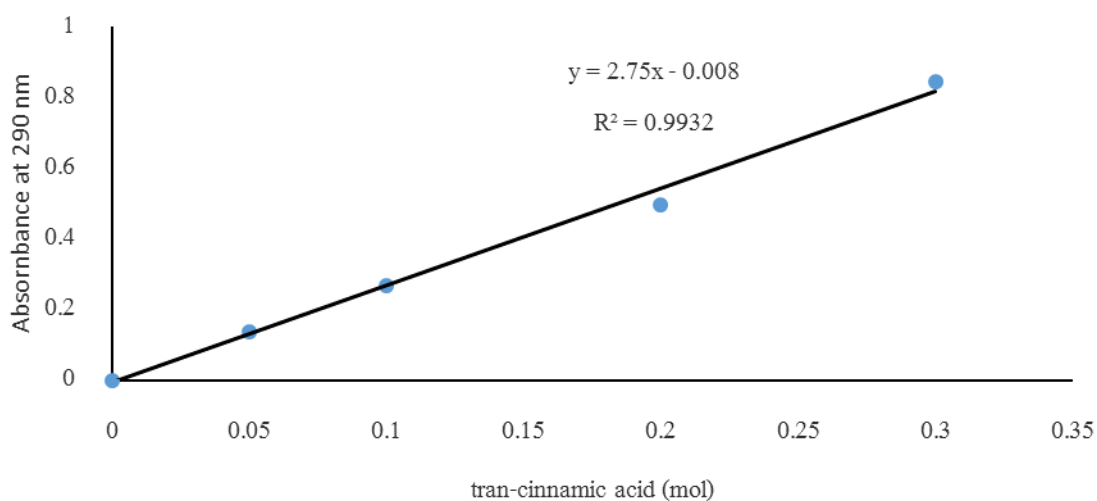
ปรับ pH ของสารละลาย ให้ได้ 8.5

- b. 0.1 M L-phenylalanine 30 มิลลิลิตร
 - L-phenylalanine 0.5 กรัม
 - 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) 30 มิลลิลิตร

- c. 6 N Hydrochloric acid 100 มิลลิลิตร
 - Hydrochloric acid 7.93 มิลลิลิตร
 - น้ำกลั่น 92.07 มิลลิลิตร

5. เตรียมกราฟมาตรฐานของ tran-cinnamic acid

- เตรียม stock solution ความเข้มข้น 1 mol tran-cinnamic acid โดยชั่งสาร tran-cinnamic acid 0.015 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
- ทำการ dilution ที่ความเข้มข้น 0.3, 0.2, 0.1, 0.05, และ 0 mol
- นำสารละลาย tran-cinnamic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นละ 200 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.1 M L-phenylalanine 5 ไมโครลิตร และ 0.1 M Tris-HCl 1,300 ไมโครลิตร จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 6 N Hydrochloric acid 100 ไมโครลิตร
- วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตร



ภาพภาคผนวกที่ 4 กราฟมาตรฐานของสารละลาย tran-cinnamic acid สำหรับคำนวณกิจกรรมของ เอนไซม์ PAL

การประเมินระดับการแสดงออกของยีน

1. การเตรียม Extraction buffer (สกัดอาร์เอ็นเอ) 50 มิลลิลิตร

- 0.2 M Sodium chloride 0.58 กรัม
- 0.1 M Tris-HCl 1.57 กรัม
- 0.01M Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt 0.37 กรัม
- 1.5% Sodium dodecyl sulfate 0.75 กรัม
- 1.5% Polyvinyl polypyrrolidone 0.75 กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร หลังจากสารละลายอย่างสมบูรณ์ ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร และปรับ pH ให้ได้ 7.0

2. การเตรียม 0.1% DEPC water 1,000 มิลลิลิตร

- น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร
- DEPC 1 มิลลิลิตร

ในการเตรียม DEPC ต้องเตรียมในตู้ดูดควัน เนื่องจาก DEPC เป็นสารก่อมะเร็ง ผสมสารให้เข้ากัน โดยการ stirring นาน 8 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที (นึ่งฆ่าเชื้อ 2-3 รอบ เพื่อให้กลิ่นของ DEPC หายไป)

3. การเตรียม Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1) 100 มิลลิลิตร

- Chloroform 96 มิลลิลิตร
- Isoamyl alcohol 4 มิลลิลิตร

4. การเตรียม 8 M LiCl 50 มิลลิลิตร

- LiCl 16.92 กรัม
- น้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่น จนสารละลายหมด และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที

5. การเตรียม 2 M LiCl	50	มิลลิลิตร
- LiCl	4.23	กรัม
- น้ำกลั่น	40	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่นจนสารละลายหมดและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที

6. การเตรียม 3 M Sodium acetate (pH 5.2)	100	มิลลิลิตร
- Sodium acetate	40.82	กรัม
- น้ำกลั่น	70	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่นจนสารละลายหมดและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร และทำการปรับ pH ให้ได้ค่า 5.2 หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที

