บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความเป็นมาของยางพารา

คาอุท์ชุค (Caoutchouc) เป็นชื่อที่ชาวพื้นเมืองในอเมริกากลางและอเมริกาใต้ใช้เรียกต้นไม้ที่ให้น้ำยาง ซึ่งชาวพื้นเมืองเหล่านี้ได้รู้จักและใช้ประโยชน์จากยางบ้างแล้ว เช่น ชาวพื้นเมืองในอเมริกากลา งใช้ยางทำรอง เท้า กระทั่งปี พ .ศ. 2313 (1770) โจเซฟ พริสลี่ (Joseph Priestley) นักสำรวจชาวยุโรปพบว่า ยางสามารถลบรอยดินสอบนกระดาษได้ โดยไม่ทำให้กระดาษเสียหาย จึงเรียกว่า Rubber จนถึงสมัยที่มีการปลูกยางมากในประเทศแถบอเมริกาใต้ จึงค้นพบว่า ต้นยางชนิด *Hevea brasiliensis* ให้ผลผลิตน้ำยางดี จึงมีการปลูกและซื้อขายกันมากขึ้น มีศูนย์กลางการซื้อขายอยู่ที่เมืองท่าบนฝั่งแม่น้ำอเมซอนชื่อว่า พารา (Para) ประเทศบราซิล จึงมีชื่อเรียกอีกอย่างว่า ยางพารา และเป็นชื่อที่ใช้เรียกกันอย่างแพร่หลายจนถึงปัจจุบัน สำหรับในประเทศไทยได้มีก ารนำต้นยางพารามาปลูกเป็นครั้งแรกในปี พ .ศ. 2442 โดยพระยารัษฎานุประดิษฐ์มหิศรภักดี (คอซิมบี้ ณ ระนอง) ซึ่งได้ปลูกที่อำเภอกันตัง จังหวัดตรัง หลังจากนั้นได้มีการปลูกยางพารากันอย่างแพร่หลายใน 14 จังหวัดภาคใต้และเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของภาคใต้ การปลูกยางได้แพร่กระจายไปยังภูมิภาคอื่นๆ ของไทย การพัฒนาอุตสาหกรรมยางของประเทศได้เจริญก้าวหน้าเรื่อยมาจนทำให้ประเทศไทยเป็นประเทศที่ผลิตและส่งออกยางได้มากที่สุดของโลก (เอกชัย พฤกษ์อำไพ. 2547 : 7)

2.2 อนุกรมวิธานของยางพารา

ยางพารามีชื่อวิทยาศาสตร์ เรียกว่า *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Muell. Arg. จัดอยู่ในหน่วยอนุกรมวิธาน (United States Department of Agriculture. 2010) ดังนี้

Kingdom: Plantae – plants

Subkingdom: Tracheobionta – Vascular Plants

Superdivision: Spermatophyta – Seed Plants

Division: Magnoliophyta – Flowering Plants

Class: Magnoliopsida – Dicotyledons

Subclass: Rosidae

Order: Euphorbiales

Family: Euphorbiaceae - Spurge Family

Genus: *Hevea*

Species: *brasiliensis*

2.3 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของยางพารา

ยางพาราเป็นพืชยืนต้น ใบเลี้ยงคู่ที่มีลำต้นขนาดใหญ่ มีอายุยืนยาวหลายสิบปี ซึ่งมีส่วนประกอบต่างๆ ดังนี้

2.3.1. ราก (Root) ยางพารามีระบบรา กเป็นระบบรากแก้ว (Tap Root System) ประกอบด้วยระบบรากแก้ว (Tap Root) รากแขนง (Lateral Root) และรากฝอย (Fibrous Root) โดยรากแก้วทำหน้าที่ยึดลำต้นไม่ให้โค่นล้ม รากแขนงและรากฝอยจะแผ่ขยายรอบทรงพุ่มของยางพารา ทำหน้าที่ดูดซึมธาตุอาหารและน้ำ เพื่อไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ของต้นยางพารา

2.3.2. ลำต้น (Stem) ต้นยางพาราเป็นไม้เนื้ออ่อน ประกอบด้วย 3 ส่วน ส่วนแรก คือ เนื้อไม้ (Wood) ประกอบด้วยส่วนที่เป็นเนื้อไม้แข็ง และส่ว นที่เป็นเนื้อไม้อ่อน ส่วนที่สอง คือ เยื่อเจริญ (Cambium) เป็นเยื่อบางๆ ที่อยู่ระหว่างเนื้อไม้กับเปลือกไม้ ส่วนของเยื่อเจริญจะมีการแบ่งตัวตลอดเวลา เพื่อสร้างความเจริญเติบโตให้กับต้นยาง สำหรับส่วนที่สามคือ เปลือกไม้ (Bark) อยู่ด้านนอกสุด เป็นส่วนที่มีความสำคัญมาก เพราะท่อน้ำยางจะอยู่บริเวณนี้ เปลือกยางพาราแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ เปลือกชั้นใน (Soft Bark) อยู่ติดกับเยื่อเจริญ เป็นส่วนของเนื้อเยื่อและท่อน้ำ ยางที่สร้างขึ้นมาใหม่ มีจำนวน ท่อน้ำยางหนาแน่นและสมบูร ณ์ที่สุด เปลือกชั้นนี้จะมีความอ่อนนุ่มและบาง ประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ ของความหนาของเปลื อกทั้งหมด เปลือกชั้นกลาง (Hard Bark) อยู่ถัด

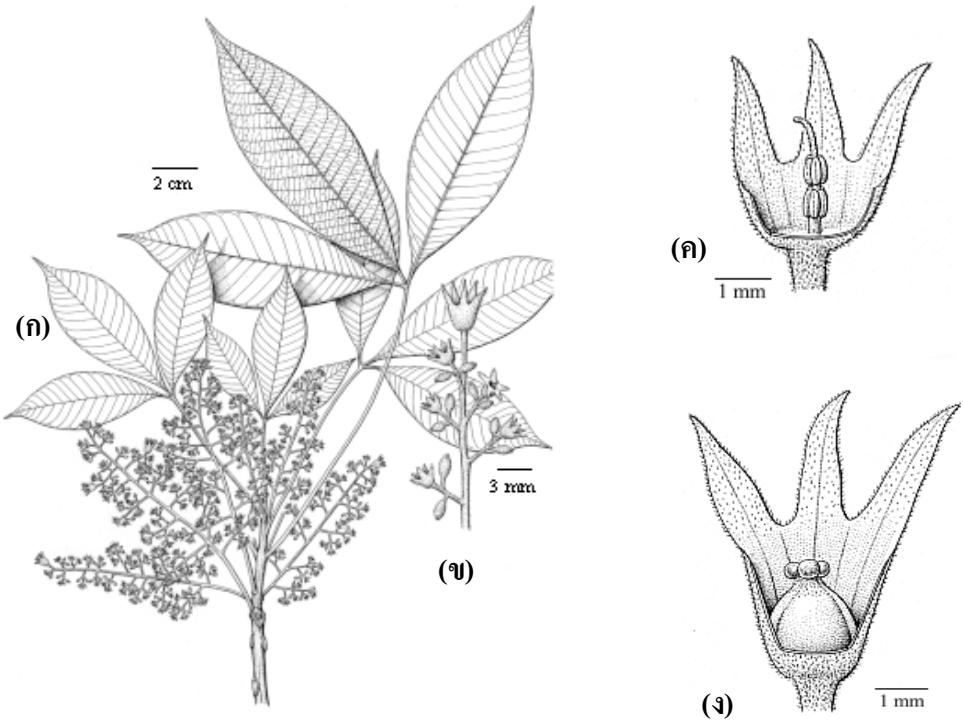
จากเปลือกชั้นในออกมาทางด้านนอก (ภาพที่ 1) เปลือกชั้นนี้มีลักษณะแข็ง เพราะมี Stone Cell ส่วนเปลือกชั้นนอก (Cork) อยู่ด้านนอกสุด มีสีน้ำตาลประกอบด้วยเนื้อเยื่อที่ตายแล้ว ทำหน้าที่ป้องกันอันตรายให้ต้นยางและช่วยรักษาความชื้นให้แก่ส่วนของเปลือกไม้ที่อยู่ถัดไป

2.3.3. ใบ (Leaf) จัดเป็นใบประกอบ (Compound Leaf) โดยทั่วไปใบประกอบด้วย 1 ก้านใบ มีใบย่อยเรียกว่า Trifoliate Leaves มี 3-5 ใบ ขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์ มีหน้าที่หลักในการสังเคราะห์แสงและการคายน้ำ ใบยางจะแตกออกมาเป็นชั้นๆ เรียกว่า ฉัตร ลักษณะของใบมีรูปร่างแตกต่างกัน เช่น มีลักษณะรูปไข่ หรือรูปรี มีสีเขียวเข้มและอ่อน เป็นต้น ขนาดของใบยาวประมาณ 10-20 เซนติเมตร จากการศึกษาของสมพร จ อนด้วง (2549 : 66) พบว่าโครงสร้างภายนอกของใบยางพารา 5 สายพันธุ์ (RRIM600, RRIT251, KJT, PR255, PR261) ส่วนใหญ่มีลักษณะคล้ายกัน ส่วนการผลิใบของยางพาราเกิดขึ้นตามฤดูกาล จะผลัดใบในช่วงฤดูแล้งของทุกปี ยกเว้นยางต้นเล็กที่ยังไม่แตกกิ่งก้านสาขาหรืออายุไม่ถึง 3 ปีจะไม่ผลัดใบ นอกจากนี้ยางพาราในแต่ละภูมิภาคมีการผลิใบในช่วงเวลาต่างกัน ภาคใต้จะผลิใบระหว่างเดือนมีนาคมถึงเดือนพฤษภาคม ส่วนภาคตะวันออกจะผลิใบระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนเมษายน

2.3.4. ดอกยาง (Flower) มีลักษณะเป็นช่อแบบ Panicle มีทั้งดอกตัวผู้และดอกตัวเ มียในช่อเดียวกัน ดอกมีสีเหลืองอ่อนหรือสีขาว กลิ่ นหอม ก้านดอกสั้น ไม่มีกลีบดอก ดอกยางทำหน้าที่ในการผสมพันธุ์ โดยการผสมแบบเปิด มีแมลงเป็นพาหะ ดอกยางจะออกตามปลายกิ่งของยางหลังจากที่ต้นยางผลัดใบ ปกติยางออกดอกปีละ 2 ครั้ง ประมาณเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนมิถุ นายน และออกดอกอีกครั้งในเดือนสิงหาคมถึงเดือนตุลาคม (ภาพที่ 1)

2.3.5. ผล (Fruit) ผลยางพาราเป็นแบบ Capsule มีลักษณะเป็นรอยหยักมีเมล็ดอยู่ภายในผลอ่อนมีสีเขียว ผลแก่มีสีน้ำตาลและแข็ง มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.5-5.0 เซนติเมตร ผลยาง จะแก่เต็มที่เมื่อมีอายุประมาณ 4-6 เดือน หลังจากผสมเกสรผลที่แก่จะแตกออก และเมล็ดจะดีดออกไปไกล

2.3.6. เมล็ด (Seed) มีขนาดใหญ่ รูปร่างกลมถึงรีแล้วแต่สายพันธุ์ เปลือกของเมล็ดแข็ง มีสีน้ำตาลอ่อน สีเทา มีจุดสีน้ำตาลเข้ม เมล็ดประกอบด้วย 3 ส่วน คือ เปลือกเมล็ด (Seed Coat) เอ็น-โดสเปอร์ม (Endosperm) และต้นอ่อน (Embryo) เปลือกจะทำหน้าที่ป้องกันเอ็นโดสเป อร์ม และต้นอ่อนจากอันตรายภายนอก เอ็นโดสเปิร์มทำหน้าที่สะสมอาหารสำหรับต้นอ่อนในระยะแรก ส่วนต้นอ่อนที่ประกอบด้วยใบเลี้ยง ปลายราก และยอดอ่อน ก็จะเจริญเติบโตเป็นต้นยางพาราต่อไป (สมศักดิ์ วรรณศิริ. 2542 : 5)

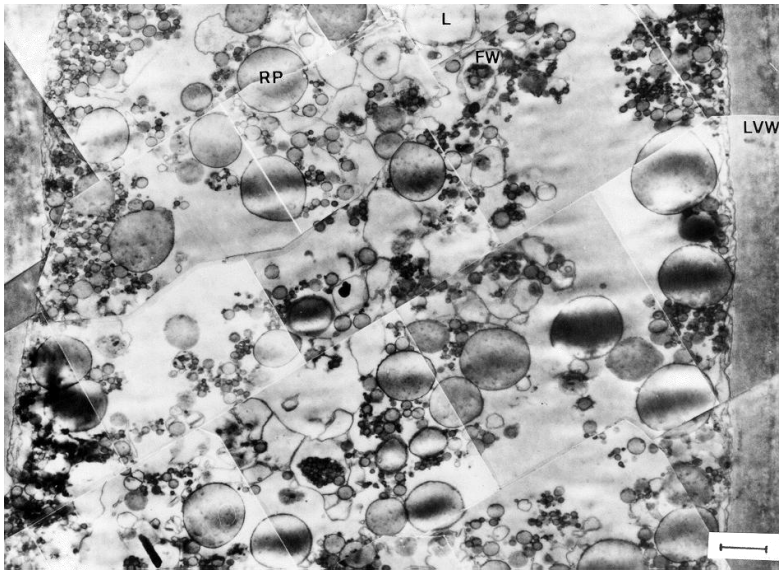


ภาพที่ 1 ส่วนของใบยางพารา และดอก (ก) ใบ (ข) ดอก (ค) ดอกเพศผู้ (ง) ดอกเพศเมีย
(ที่มา: Sam and Welzen. 2004. Retrieved July 20, 2011, from
http://www.nationaalherbarium.nl/euphorbs/specH/Hevea.htm.)

2.4 น้ำยาง (Latex)

พืชที่สามารถสร้างน้ำยางได้จะมีเซลล์พิเศษ เพื่อทำหน้าที่สร้างและเก็บน้ำยางเรียกว่า Laticifer Cell เมื่อตัดลำต้นของยางพาราตามขวางพบว่า เซลล์ดังกล่าว มีการเรียงตัวเป็นระเบียบขนานกับแคมเบียม โดยมีเซลล์พาเรงคิมาเป็นตัวกั้นและพบได้ทุกส่วนของยางพารา เช่น ลำต้น ใบ และราก แต่พบมากที่สุดในส่วนของลำต้น

น้ำยางมีลักษณะเป็นของเหลวสีขาวปนเหลือง ส่วนประกอบของน้ำยางแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกคือส่วนที่เป็นเนื้อยาง เป็นอนุภาคที่แขวนลอยอยู่ในน้ำยาง เป็นสารพวกไฮโดรคาร์บอนที่มีโมเลกุลใหญ่ ไม่ละลายน้ำ ในสภาพน้ำยางสดจะถูกห่อหุ้มด้วยชั้นของไขมันและสารจำพวกโปรตีน ส่วนที่สองเป็นส่วนที่ไม่ใช่ยาง ประกอบด้วยส่วนที่เป็นน้ำและส่วนของลูทอยด์ (Lutoid) ส่วนที่เป็นน้ำเรียกว่า ซีรัม (Serum) ประกอบด้วยสารพวกคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และกรดอะมิโน (เอกชัย พฤกษ์อำไพ. 2547 : 12) (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 Electron Micrograph ของท่อน้ำยางที่ตัดตามยาว ซึ่งประกอบด้วย Rubber Particle (RP), Lutoid (L), Frey-Wyssling Particle (FW) และ Latex Vessel Wall (LVW) (ที่มา: Malaysia Rubber Board. 2011. Retrieved July 20, 2011, from http://www.lgm.gov.my/RnD/biotech.aspx.)

2.5 สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการปลูกยางพารา

กรมส่งเสริมการเกษตร (สืบค้นเมื่อ 26 มิถุนายน 2553, จาก http://www.doae.go.th/-IndexHome.asp.) ระบุไว้ว่า การจะปลูกยางพาราให้เจริญเติบโตดี ทนทานแข็งแรง และให้ผลผลิตสูงสม่ำเสมอ เป็นระยะเวลานาน ควรพิจารณาถึงสภาพแวดล้อมต่างๆ ดังนี้

2.5.1. เขตปลูกยาง ยางพาราเจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่ๆ อยู่ระหว่างเส้นรุ้งที่ 10 องศาใต้ ถึง 15 องศาเหนือของเส้นศูนย์สูตร แหล่งผลิตยางพาราที่สำคัญมีปริมาณผลผลิตมาก จะอยู่ระหว่างเส้นรุ้งที่ 6 องศาเหนือและใต้ของเส้นศูนย์สูตร ยางพาราที่ปลูกห่างจากเส้นศูนย์สูตรมากจะเจริญเติบโตช้า และเปิดกรีดช้าลง

2.5.2. ความสูงของพื้นที่จากระดับน้ำทะเล โดยทั่วไปยางพาราจะปลูกอยู่ในพื้นที่ราบจนถึงพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเล 200 เมตร การปลูกยางพาราในพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเลเกินกว่า 200 เมตรขึ้นไป ทุก ๆ ระดับความสูงที่เพิ่มขึ้นแต่ละ 100 เมตร อุณหภูมิจะลดลง 0.5 องศาเซลเซียส ทำให้ต้นยางเจริญเติบโตช้า และมีผลทำให้เปิดกรีดช้าไปประมาณ 6 เดือน

2.5.3. ความลาดเทของพื้นที่ ต้นยางที่ปลูกในพื้นที่ที่มีความลาดเทมาก การเจริญเติบโตจะต่ำกว่าต้นยางที่ปลูกในพื้นที่ที่มีความลาดเทน้อย ทั้งนี้เพราะพื้นที่ที่มีความลาดเทมาก ดินจะเก็บ

ความชื้นได้น้อยลงและมีการชะล้างสูง การปลูกยางในพื้นที่ที่มีความลาดเทเกิน 15 องศา ควรปลูกแบบขั้นบันได

2.5.4. ดิน ดินที่เหมาะสมต่อการปลูกยางพารา ควรมีเนื้อดินเป็นดินเหนียว ดินร่วน หรือดินร่วนเหนียวปนทราย ไม่เป็นดินเค็ม มีการระบายน้ำและอากาศดี ความเป็นกรดด่าง (pH) 4.0 – 5.5 มีหน้าดินลึกไม่น้อยกว่า 1 เมตร ไม่มีชั้นของหินแข็ง ดินดาน ระดับน้ำใต้ดินต่ำกว่า 1 เมตร

2.5.5. ฝนและการกระจายของฝน พื้นที่ๆ จะปลูกยางพาราให้ประสบผลสำเร็จดีนั้น ควรมีปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยไม่ต่ำกว่า 1,350 มิลลิเมตรต่อปี และมีจำนวนวันฝนตกเฉลี่ยไม่ต่ำกว่า 120 วัน/ปี

2.5.6. ความชื้นสัมพัทธ์ ความชื้นสัมพัทธ์ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นยางจะอยู่ระหว่าง 65 - 90 เปอร์เซ็นต์ ในพื้นที่ที่มีความชื้นสัมพัทธ์ต่ำเป็นระยะเวลานานจะมีผลกระทบต่อต้นยางที่ปลูกใหม่มาก หากกระทบแล้งหรือสภาพความชื้นในบรรยากาศต่ำเป็นระยะเวลานานจะมีอัตราการตายสูง

2.5.7. อุณหภูมิ อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการปลูกยางพาราอยู่ระหว่าง 18-35 องศาเซลเซียส แต่ถ้าอุณหภูมิเฉลี่ยตลอดปีแตกต่างกันไม่มาก คือ 24-27 องศาเซลเซียส จะเป็นช่วงที่มีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการปลูกยางพาราเพื่อให้ได้ผลผลิตสูง

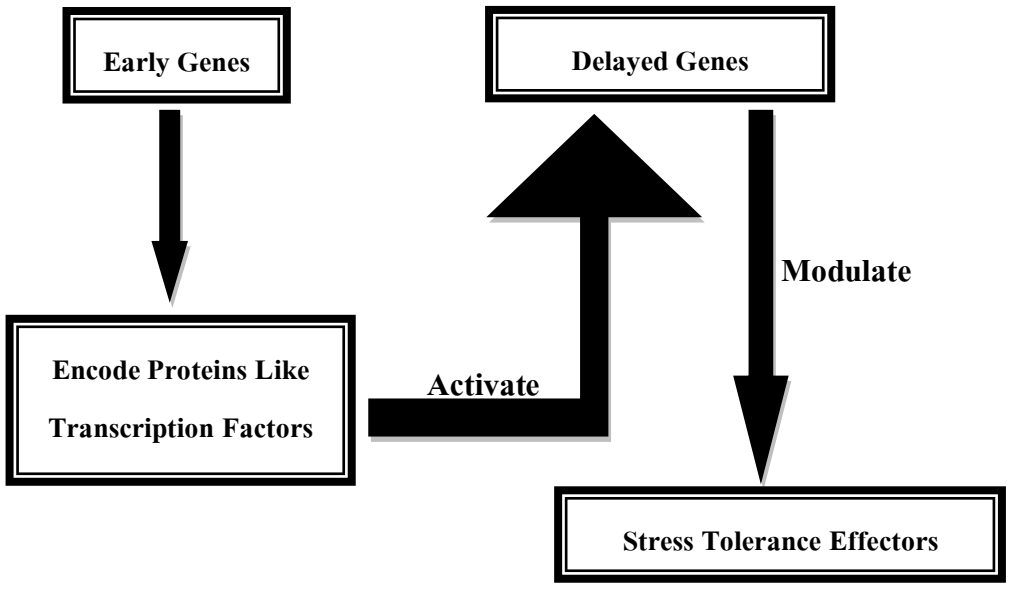
2.5.8. ลม ความเร็วลมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยางพาราควรเฉลี่ยตลอดปีไม่เกิน 1 เมตรต่อวินาที หากความเร็วลมเฉลี่ยตลอดปี 2.0-2.9 เมตรต่อวินาที จะเป็นปัญหาต่อการเจริญเติบโตและการไหลของน้ำยาง

2.6 กลไกการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมในพืช

สิ่งแวดล้อมมีผลต่อการเจริญเติบโตและการ ให้ผลผลิต ของพืช พืชที่ สามารถ เจริญเติบโตในถิ่นอาศัยแบบใดได้ จะต้องมีลักษณะที่มีความเหมาะสมหรือสามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมที่เป็นอยู่นั้นได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามไม่ว่าถิ่นอาศัยจะมีสภาพแวดล้อมเป็นแบบใด ก็ไม่ได้มีความคงที่หรืออยู่ในระดับที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชเสมอไป ในบางช่วงเวลาหรือบางฤดูกาลพืชจะต้องเผชิญกับภาวะของสิ่งแวดล้อมที่ ไม่เหมาะสม เรียกภาวะนี้ว่า ภาวะเครียด (Stress) มีทั้ง Abiotic Stresses ได้แก่ แห้งแล้ง (Drought) อุณหภูมิ (Temperature) ความเค็ม (Salinity) รังสี (Radiations) สารเคมีและมลพิษ (Chemicals and Pollutants) เป็นต้น และ Biotic Stress ได้แก่ การเกิดโรคจากแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส (Pathogens: Bacteria, Fungi, Viruses) แมลง (Insects) และการเกิดบาดแผล (Wounding) เป็นต้น พืชแต่ละชนิดจะมีระดับการตอบสนองหรือ มีความไวต่อภาวะความเครียดที่ได้รับแตกต่างกัน รวมทั้งมีการปรับตัวในรูปแบบและวิธีการที่อาจจะแตกต่างกันไป

ด้วย เมื่อพืชได้รับภาวะความเครียด เมทาบอลิซึมต่างๆ ของฮอร์โมนภายในพืชมักจะเป็นสิ่งแรกที่มีการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ต่างๆ ที่เกิดขึ้น ซึ่งหากภาวะความเครียดดำเนินไปในช่วงระยะเวลาสั้นๆ การเปลี่ยนแปลงอาจเกิดขึ้นเพียงในระดับกระบวนการเมทาบอลิซึม เท่านั้น แต่หากภาวะเครียดเกิด ขึ้นติดต่อกันเป็นระยะเวลา ยาวนาน อาจพบการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นในระดับสัณฐานวิทยา (Morphology) ได้ เช่น ยางพารา ในช่วง ฤดูร้อนต้นยางมีการผลัดใบ การผลัดใบก็เป็นกลไกการตอบสนองของพืช เพื่อลดการคายน้ำในช่วงแห้งแล้ง และเก็บสะสมอาหารไว้เลี้ยงส่วนของลำต้น เพื่อรอสภาพอากาศที่เหมาะสมจึงผลิใบอีกครั้ง หากฤดูร้อนมีช่วงเวลาที่ยาวนานและระหว่างนั้นมีการกรีดยางซ้ำอีก พบว่าน้ำ ยางไม่ไหลแ ละอาจส่งผลให้เกิดอาการเปลือกยางแห้ง ได้ สอดคล้องกับกา รศึกษาของภิรมย์ญา แดงสว่าง (2554 : 16) พบว่า ในสภาพที่แห้งแล้งต้นยางมีโอกาสแสดงอาการเปลือกยางแห้งสูงกว่าในพื้นที่ๆ มีฝนตกชุก รวมทั้งการกรีดถี่ก็มีผลเช่นเดียวกัน

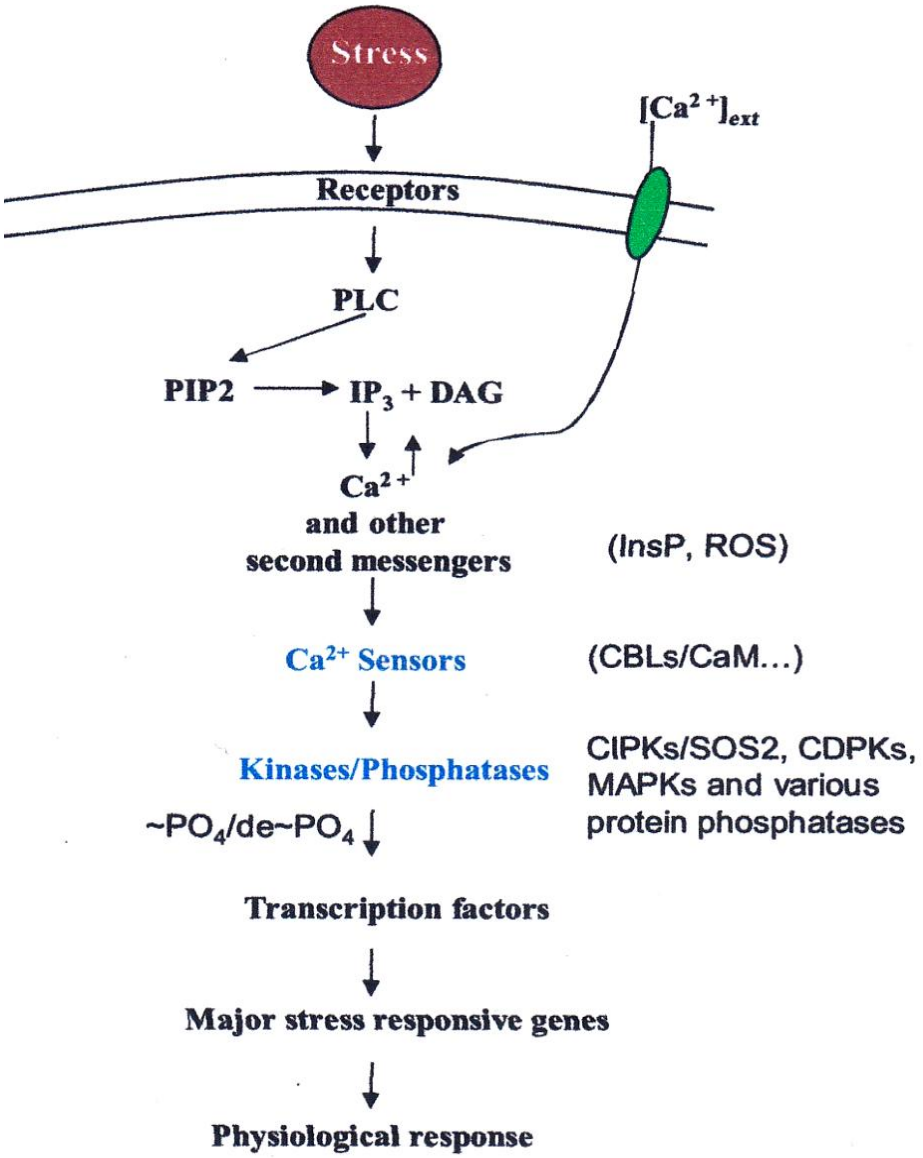
จากการศึกษาการตอบสนองต่อ Stress ในพืช ไม่ว่าจะเป็น Abiotic หรือ Biotic Stresses พบว่า มีการตอบสนองผ่านการทำงานของยีน 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เรียกว่า Early Genes เป็นกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกทันทีหลังจากที่ได้รับสัญญาณการกระตุ้นจากภาวะ Stress ส่วนยีนกลุ่มที่ 2 เรียกว่า Delayed Genes เป็นกลุ่มยีนที่ มีการ แสดงออกหลังจากที่ถูกกระตุ้น จากยีนกลุ่มที่ 1 การตอบสนองของยีนกลุ่มนี้จะทำให้พืชมีความทนทานต่อ Stress ได้ (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 แสดงกลไกการตอบสนองต่อ Stress ผ่าน Early Genes และ Delayed Genes
(ดัดแปลงจาก : Mahajan and Tuteja. 2005 : 141)

2.6.1. กลไกการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมที่ไม่มีชีวิต (Abiotic Response)

กลไกการตอบสนอง ต่อ Abiotic Stresses ในพืช พบว่ามีการตอบสนองผ่าน Stress Signaling Pathways คือ บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์จะมี Receptors ที่ทำหน้าที่รับสัญญาณ โดยมีฮอร์โมนบางชนิดที่ทำหน้าที่เป็นสารสัญญาณ เช่น ฮอร์โมน ABA (Abscisic Acid) จากนั้นก็จะส่งสัญญาณเข้าไปในเซลล์ กระตุ้นฟอสโฟไลเปส ซี (Phospholipase C, PLC) และไฮโดรไลส์ ฟอสฟาทิดิลอิน - ออซิทอล- 4,5-ไบฟอสเฟส (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP_2) เพื่อสังเคราะห์อินออซิทอล-1,4,5-ไตรฟอสเฟต (Inositol-1,4,5-triphosphate, IP_3) และไดเอซิลกลีเซอรอล (Diacylglycerol, DAG) ส่งผลให้มีการสังเคราะห์สารสัญญาณ เรียกว่า สารทุติยภูมิ (Secondary Metabolite) ได้แก่ แคลเซียม , Reactive Oxygen Species (ROS), Inositol Phosphates เป็นต้น การสร้าง IP_3 และ DAG ทำให้แคลเซียมจากภายนอกเซลล์เคลื่อนที่เข้ามาในเซลล์โดยผ่านทาง Receptor-operated Ca^{2+} Channel (ROC) และแคลเซียมในแวคิวโอลถูกปล่อยออกมาในไซโตซอล (Cytosol) ทำให้ปริมาณแคลเซียมในไซโตซอลมีมากขึ้น จากนั้นแคลเซียมจะจับกับ Sensors ไปกระตุ้นให้เอนไซม์โปรตีนไคเนส (Protein Kinase , PK) เกิดกระบวนการฟอสฟอริเลชัน (Phosphorylation) นำไปสู่การกระตุ้นการแสดงออกของยีนกลุ่มที่ 1 (Early Genes) ให้มีการแสดงออกมากขึ้น และยีนกลุ่มนี้จะสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเริ่มต้นการถอดรหัส (Transcription Initiation) ได้แก่ Stress-related Transcription Factors, Calcium Sensors หลังจากนั้นโปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นจากยีนกลุ่มที่ 1 นี้ จะไปส่งเสริมให้มีการแสดงออกของยีนกลุ่มที่ 2 (Delayed Genes) ซึ่งเป็นยีนเฉพาะที่ตอบสนองต่อภาวะเครียด (Major Stress Response Genes) ให้มีการแสดงออกมากขึ้น เพื่อสังเคราะห์โปรตีนต่างๆ และมีการตอบสนองออกมาทางสรีรวิทยา ทำให้พืชมีความทนทานและสามารถเจริญเติบโตได้ (ภาพที่ 4) (Mahajan and Tuteja. 2005 : 140 ; Mazzucotelli, Mastrangelo, Crosatti, Guerra, Stanca and Cattivelli. 2008 : 426)



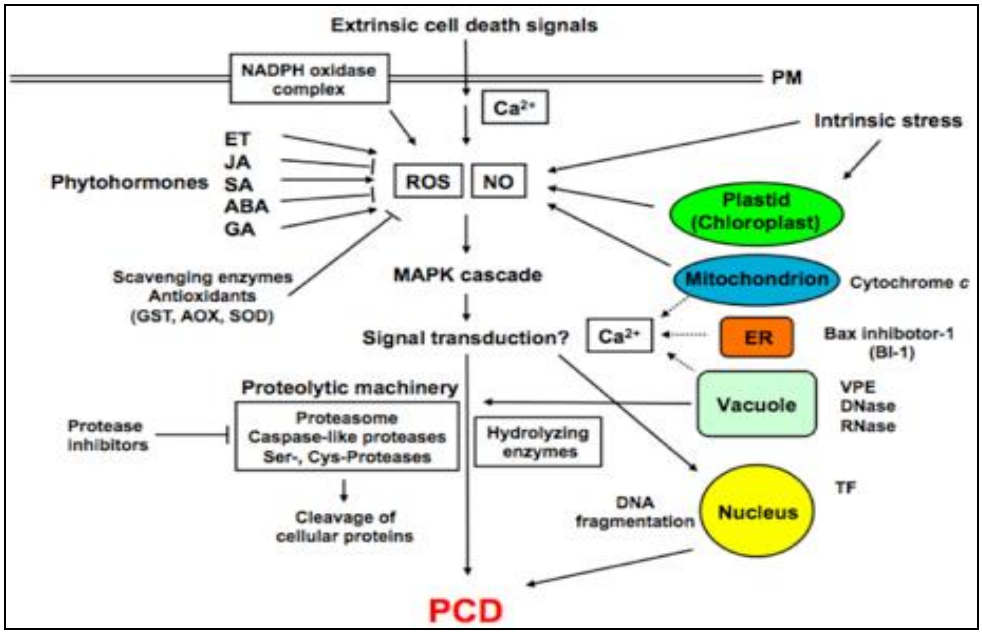
ภาพที่ 4 การตอบสนองต่อ Abiotic Stresses ผ่าน Stress Signaling Pathways

(ที่มา : Mahajan and Tuteja. 2005 : 141)

2.6.2. กลไกการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมที่มีชีวิต (Biotic Response) พืชมีระบบป้องกันตัวเองจากสิ่งแวดล้อมที่มีชีวิ ตหลายรูปแบบ การป้องกันเบื้องต้นคือ การป้องกัน ทางกายภาพ เนื่องจากพืชมีชั้นของคิวติเคิลและผนังเซลล์แข็งแรง ที่เคลือบด้วยสารพวกคิวติน แวกซ์และซูเบอริน ส่วนพืชบางชนิดมีการสร้างน้ำยางออกมาปิดบาดแผลสามารถป้องกันการรุกรานของเชื้อโรค และการแพร่ของธาตุบางชนิดเข้าสู่เซลล์ ได้ นอกจากนี้ยังมีการป้องกันระดับภายในเซลล์ ซึ่งมีรูปแบบการตอบสนอง 2 แบบด้วยกัน

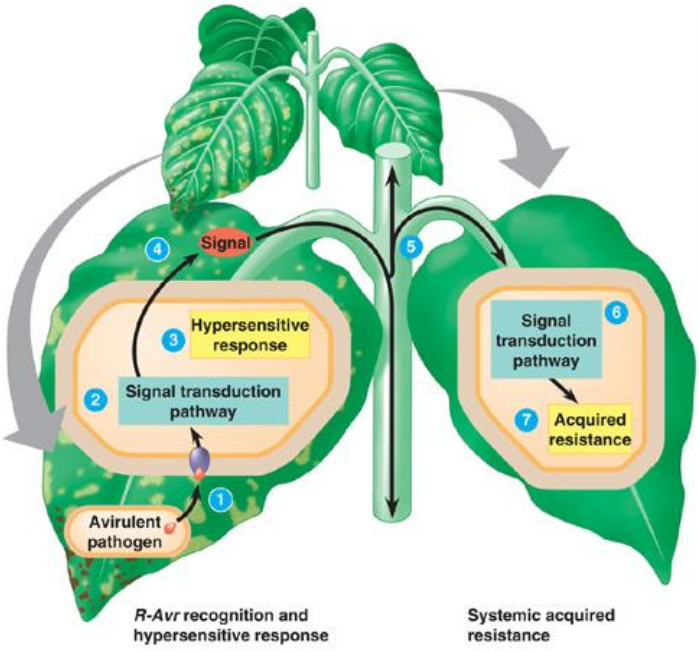
- Hypersensitive Response (HR) เป็นการตอบสนองที่เกิดขึ้นทันทีหลังจากที่รับรู้สัญญาณการบุกรุกจากเชื้อรา เนื่องจากที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์มี Receptor ที่จะ รับรู้ถึงการบุกรุก และส่งสัญญาณเข้าไปในเซลล์ จากการศึกษาพบว่าสารที่ทำหน้าที่เป็นสารสัญญาณใน การตอบสนองแบบ HR คือ NADPH Oxidase Complex (Seong, et al. 2007b : 983) ซึ่ง NADPH Oxidase จะไปกระตุ้นให้มีการสร้าง สาร อนุมูลอิสระ (Reactive Oxygen Species, ROS) ได้แก่ Superoxide (O_2^-) และ Hydrogen Peroxide (H_2O_2) สารอนุมูลอิสระนี้จะแตกตัวเป็นลูกโซ่กับสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์และโมเลกุลของเชื้อที่บุกรุกเข้ามา ส่งผลให้เกิด การตายของเซลล์ ในบริเวณที่มีการตอบสนองเพื่อช่วยในการทำลายแหล่งอาหารและยับยั้งการแพร่กระจาย ของเชื้อโรค เรียกกระบวนการนี้ว่า Programmed Cell Death (PCD) กระบวนการนี้จะเกิดได้อย่างสมบูรณ์ต้องอาศัยสารสัญญาณอีกอย่างคือไนตริกออกไซด์ (Nitric Oxide, NO) เมื่อภายในเซลล์มี NO และ ROS ทำให้ เกิดการสังเคราะห์ สาร ต่าง ๆ เพื่อทำหน้าที่ ในวิถีการสังเคราะห์สารป้ องกัน เช่น Salicylic Acid (SA), Jasmonic Acid (JA), Ethylene (ET) เป็นต้น (ภาพที่ 5)

- Systemic Acquired Resistance (SAR) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้ นหลังจากที่ได้รับสารสัญญาณ จาก HR โดยมีฮอร์โมน SA ทำหน้าที่ส่งสัญญาณ ให้มีการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) เช่น Elicitin, Phytoalexins, Pathogenesis-Related Proteins (PR-proteins) Anthocyanin, Limonene, Mental และ Curcumin เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้ จะทำหน้าที่เป็น Free Radical-Scavenger หรือ Antioxidant, Chemo-Resistance Agent, Anti-Mutative Agent มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแพร่กระจายของแบคทีเรียและเชื้อรา ซึ่งกระบวนการนี้จะเกิดขึ้นหลังจากที่พืชติดเชื้อแล้ว ทำให้ต้นพืชไม่ตาย (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 5 กระบวนการเกิด Programmed Cell Death ในพืช

(ที่มา : Eric Lam Laboratory. 2010. Retrieved September 14, 2011, from http://aesop.rutgers.edu/~lamlab/pcd/pcd.html.)



ภาพที่ 6 รูปแบบการตอบสนองต่อ Biotic Stresses ในพืช

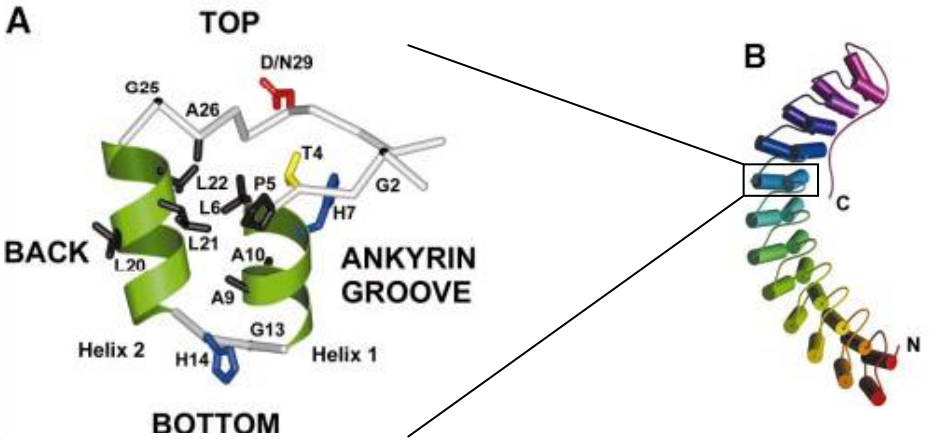
(ที่มา : Krempels. 2009. Retrieved September 14, 2011, from http://www.bio.miami.edu/dana/226/226F08_21print.html.)

2.7 Ankyrin Repeat Proteins (ANK)

Ankyrin เป็น โปรตีน กลุ่ม หนึ่งที่พบมากในสิ่งมีชีวิตทั่วไปตั้งแต่ใน ไวรัสจนถึงมนุษย์ (Sedgwick and Smerdon. 1999 : 311) โดยโปรตีน ANK หนึ่งโมเลกุลประกอบด้วยกรดอะมิโน 33-36 Residues ดังนั้นโปรตีนที่มี ANK หนึ่งหรือมากกว่าซ้ำๆ กันในโครงสร้าง เรียกว่า Ankyrin Repeat Protein โดยจำนวนซ้ำของ ANK จะแตกต่างกันไป มีประมาณ 2 ถึง 34 ซ้ำต่อหนึ่งโปรตีน (Tandem) ชนิดที่พบมากเป็นโปรตีนที่มี ANK 6 ซ้ำ ส่วนโปรตีน ANK ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดมีจำนวน 34 ซ้ำ พบในปรสิตมีชื่อว่า *Giardia lamblia* (Mosavi, Minor and Peng. 2002 : 16030)

2.7.1 โครงสร้างทุติยภูมิ (Secondary structure) ของ ANK

โครงสร้างพื้นฐานโปรตีน ANK (Single Ankyrin Repeat) เป็นแบบ L-Formational Shape ประกอบด้วย α-Helix 2 สายขนานในทิศทางตรงข้าม มกัน เชื่อมกับส่วนของ β-Loop ทำมุม 90 องศา โปรตีน ANK มีบริเวณ Conserved Sequence ที่สำคัญประกอบด้วยกรดอะมิโน 4 ชนิดคือ Threonine (T), Proline (P), Leucine (L), Histidine (H) เรียกบริเวณนี้ว่า TPLH Motif เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้ ANK มีโครงสร้างเป็นแบบ L-form นั่นคือ P เป็นจุดเริ่มต้นของการเกิด Helix อยู่ตำแหน่งที่ 5 จับกับ H ด้วยพันธะไฮโดรเจนซึ่งอยู่ตำแหน่งที่ 7 ส่วน L อยู่ที่ตำแหน่งที่ 6 ของ Helix และ T อยู่ตำแหน่งที่ 4 ตรงบริเวณ Loop ดังภาพที่ 7 (Voronin and Kiseleva. 2007 : 990)



ภาพที่ 7 แสดงโครงสร้างแบบ L-Form และตำแหน่งของกรดอะมิโน TPLH ในโครงสร้างของ Human Ankyrin R

(ที่มา : Michaely, Tomchick, Machius and Anderson. 2002 : 6389)

2.7.2 บทบาทหน้าที่ของ ANK

ANK เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่หลากหลายในสิ่งมีชีวิต ดังตารางที่ 1

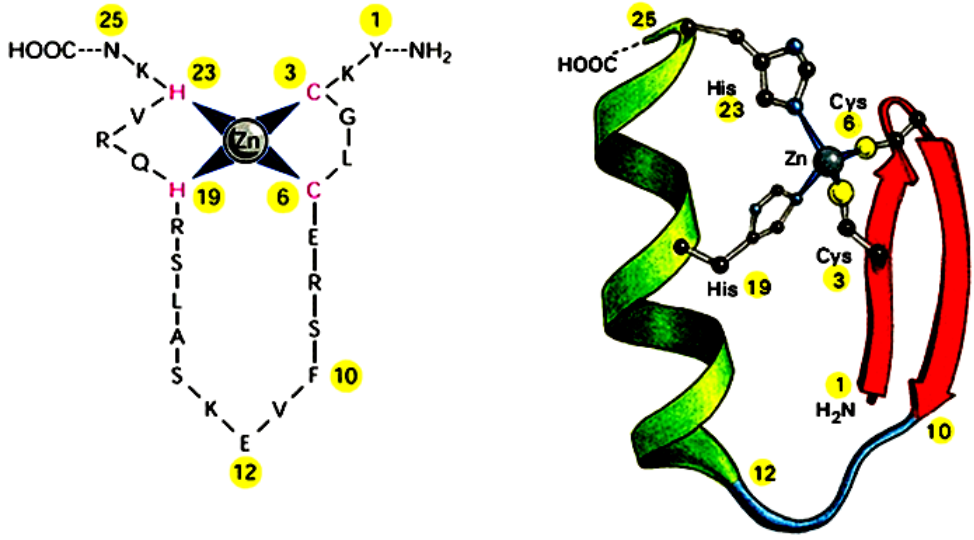
ตารางที่ 1 Family ของ ANK ที่พบได้ทั้งในสัตว์ พืช และแบคทีเรีย

(ที่มา : Voronin and Kiseleva. 2007 : 991)

สิ่งมีชีวิต	โปรตีน	จำนวนซ้ำของ Ankyrin	หน้าที่
สัตว์	IkB	6-7	Regulation of Transcription
	BCL-3	7	Oncoprotein, Regulator of Transcription
	BARD1	3	Inhibitor of Polyadenylation
	INK4	3,4,5	Tumor Supressors, Cell Cycle Regulator
	Mbp1	4	Transcription Factor
	Tvl-l	4	Adaptor of Signal Transduction
	REXANK	4	Tumor Suppressor
	Notch (Drosophila)	7	Determination of Cells, Participation in Early Development (Embryogenesis)
พืช	NRP1/NIM	4	Regulation of Transcription
	CpSRP43	4	Signal Transduction in Chloroplast
	KR1	2	Transcription Factor
	NPR1 and AKR2	-	Programmed Cell Death
ยีสต์	Swi4	4	Transcription Factor
	Swi6	4	Transcription Factor
แบคทีเรีย	ankA	11	Initiator of Infection in Eukaryote
	ankB	-	Provides Localization of Catalase
ไวรัส	FWPV	33	Role of Poxvirus ANK Proteins in the Manipulation of the Host Cell's Ubiquitination System (Sonnberg, Seet, Pawson, Fleming and Mercer. 2008 : 10955)
	SWPV	4	
	LSDV	5	
	MYXV	4	

2.8 Zinc Finger Protein (ZFP)

เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับ การถอดรหัส (Transcription) ทำหน้าที่เป็น TF และ Regulatory Protein ที่เข้าทำปฏิกิริยากับลำดับเบสเฉพาะที่อยู่ภายในดีเอ็นเอ เพื่อทำให้เกิดกระบวนการเริ่ม ต้นการสังเคราะห์โมเลกุล mRNA ได้ดีขึ้น ZFP ประกอบด้วย 2 Domains คือ Domain แรกประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 70 โมเลกุล อยู่บริเวณด้านปลายคาร์บอกซิล (C-Terminal End) ของโปรตีน เกี่ยวข้องกับการ กระตุ้น (Activation Region) การเกิดปฏิกิริยาต่างๆ ในกระบวนการถอดรหัส ส่วน Domain ที่ 2 จะเกี่ยวข้องกับการเข้าเกาะของโปรโมเตอร์ ซึ่งประกอบด้วย 2-10 หน่วยซ้ำ (Repeating Unit) เรียงเชื่อมต่อกัน แต่ละหน่วยซ้ำจะประกอบด้วยกรดอะมิโน 30 โมเลกุล อยู่บริเวณด้านปลาย ของหมู่อะมิโน (N-Terminal End) ของโปรตีน โดยแต่ละหน่วยมีโครงสร้างภายในเป็น Zinc Finger คือ ภายในสายพอลิเปปไทด์มีตำแหน่งที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน Cysteine 2 Residues และ Histidine 2 Residues ที่เข้ามาจับกับอะตอมของ Zn 4 พันธะ ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างที่คงตัว เรียกว่า Finger loop (ภาพที่ 8) โดยมี Hydrophobic Core Region ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน Phenylanine, Leucine และมีกรดอะมิโนที่มีประจุบวกอยู่บริเวณด้านนอกทำให้สามารถจับกับดีเอ็นเอ รวมทั้งทำปฏิกิริยากับลำดับเบสที่อยู่ด้านนอกบริเวณ Major Groove ด้วยพันธะไอออนิก เพื่อควบคุมการแสดงออกของยีน



ภาพที่ 8 โครงสร้างของ Zinc Finger Protein (ZFP)

(ที่มา : Lee. 1989. Retrieved January 25, 2010, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.)

ยีน *ZFP* ในพืชมีหลายชนิด แคม, ปีเตอร์, เรย์และกางปิง (Kam, Peter, Ray and Gang-ping. 2007 : 650) ได้วิเคราะห์การแสดงออกของยีน *Triticum aestivum* RING Zinc Finger Proteins (*TaRFP*) ในข้าวสาลี จำนวน 7 ยีน ได้แก่ *TaRZF70, TaRZF38, TaRZF47, TaRZF59, TaRZF50, TaRZF74, TaRZF8* จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนทั้ง 7 ยีนในเนื้อเยื่อต่างๆ พบว่า มีระดับการแสดงออกของยีนแตกต่างกัน คือ *TaRZF70* และ *TaRZF38* มีการแสดงออกมาก ที่สุดในเนื้อเยื่อราก *TaRZF50* และ *TaRZF74* แสดงออกมากในเอ็มบริโอและเอ็นโดสเปิร์ม *TaRZF59* มีการแสดงออกมากในรากและใบในระดับเท่าๆกัน ส่วน *TaRZF38* มีการแสดงออกมากในลำต้นและรวงข้าว (Spike) ส่วน *TaRZF47* มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อต่างๆ ในระดับใกล้เคียงกัน และเมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนดังกล่าวในใบ 4 ระยะ (Young Leaves, Mature Leaves, Old Leaves และ Senescence Leaves) พบว่า ยีนทั้ง 7 ยีนมีการแสดงออกสูงสุดใน Young Leaves และมีการแสดงออกน้อยที่สุดใน Senescence Leaves จะเห็นได้ว่าเมื่อใบมีอายุเพิ่มขึ้น ระดับเมทาบอลิซึม ในเซลล์พืชลดลง จากนั้นวิเคราะห์ผลของการขาดน้ำในใบและราก พบว่า ยีน *TaRZF70* มีรูปแบบการแสดงออกของยีนแตกต่างจากยีนทั้ง 6 ยีน เมื่อมีการกระตุ้นจากภาวะขาดน้ำ ยีน *TaRZF70* มีระดับการแสดงออกของสูงที่สุดในรากและแสดงออกน้อยที่สุดในใบ แสดงว่า *TaRZF70* อาจมีบทบาทในการตอบสนองต่อความแห้งแล้ง

ซู, ฮวง, กัว, หยาง, โบ, ตังและชาง (Xu, Huang, Guo, Yang, Bao, Tang and Zhang. 2008 : 1037) ศึกษาการแสดงออกของยีน *ZFP252* ชนิด TFIIIA ในต้นข้าว (*Oryza sativa* L.) พบว่า ยีน *ZFP252* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาวะแห้งแล้งและความเค็ม โดยจะมีบทบาทควบคุมการสร้างน้ำตาลชนิดหนึ่งให้มากขึ้น ซึ่งสารเหล่านี้ช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำและปรับสมดุลภายในเซลล์ ดังนั้น ยีน *ZFP252* เป็นยีนที่ทำให้พืชสามารถทนทานต่อความแห้งแล้งและความเค็มมากขึ้น

นอกจากนี้ ฮวง, วัง, เจียง, โบ, ฮวง, ซัน, ซู, ลันและแซง (Huang, Wang, Jiang, Bao, Huang, Sun, Xu, Lan and Zhang. 2008 : 135) ศึกษาการแสดงออกของยีน *ZFP* ในข้าวญี่ปุ่น (*Oryza sativa* sub. *japonica* cv. Jiucaiqing) ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *ZFP* และเปรียบเทียบกับต้นข้าวที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน *ZFP* พบว่า ต้นที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมีความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งและความเค็มได้ดีกว่าต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน นอกจากนี้ผลของความเย็นและความร้อนมีผลต่อการแสดงออกของยีน *ZFP* ด้วยเช่นกัน

2.9 Ankyrin-Repeat Domain Zinc Finger Protein (KR1) ในพืช

KR1 เป็นโปรตีน กลุ่มหนึ่งที่พบได้ในพืชทั่วไป จากการวิเคราะห์ (Bioinformatics Analysis) โครงสร้างของโปรตีน KR1 พบว่า KR1 ประกอบด้วยส่วนของ Ankyrin Repeat และ Zinc Finger DNA Binding Site โดย KR1 อาจเป็น Transcription Regulator ส่วนของ Ankyrin Repeat อาจจะเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา Dimerization (Seong, et al. 2007b : 987)

ซียอนและคณะ (Seong, et al. 2007a : 952) วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ (Full Length) ของยีน *KRI* ในพริก (*Capsicum annum*) และตั้งชื่อยีนนี้ว่า *Capsicum annuum* Ankyrin-Repeat Domain C_3H_1 Zinc Finger Protein (*CaKR1*) ซึ่ง Encode เป็น Ankyrin Repeat 98 Amino Acid บริเวณ N-Terminal และ Zinc Finger 26 Amino Acid บริเวณกลางของโปรตีน จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อต่างๆ ของพริกพบว่า ในภาวะปกติยีน *CaKR1* ไม่แสดงออกในเนื้อเยื่อใบและลำต้น และมีการแสดงออกเล็กน้อยในส่วนของรากกับดอก แต่ยีน *CaKR1* จะมีการแสดงออกมากเมื่ออยู่ในภาวะเครียดที่เกิดจากปัจจัยสิ่งแวดล้อมทั้ง Biotic และ Abiotic โดยยีน *CaKR1* จะกระตุ้นการสร้างฮอร์โมนบางชนิด เช่น SA, JA, ET และ ABA เป็นต้น เมื่อถ่ายโอนยีน *CaKR1* ให้กับมะเขือเทศ โดยเปรียบเทียบกับต้นปกติ (Wild Type) พบว่าเนื้อเยื่อใบของต้นมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *CaKR1* มีความหนากว่าต้นปกติ สามารถทนทานต่อการถูกทำลายด้วยเชื้อราและทนทานต่อความเค็มได้ดีกว่าต้นปกติ นอกจากนี้ยังพบว่ามะเขือเทศ ที่ได้รับยีน *CaKR1* มีการสังเคราะห์ PR-protein เพิ่มขึ้น (Seong, et al. 2007b : 983)

หยาง, ซัน, หูและหลิน (Yang, Sun, Hu and Lin. 2008 : 103) ได้โคลนและศึกษาลักษณะของยีน RING Zinc Finger Ankyrin Protein (*AdZFP1*) จาก *Artemisia desertorum* ที่ทนทานต่อความแห้งแล้งโดยเทคนิค RACE ปรากฏว่า ได้ cDNA ขนาด 1723 คู่เบส และแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 445 Residues มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 47.9 kDa เป็น ZFP ชนิด C3HC4 พบส่วนของ Ring Finger Domain ที่บริเวณ C-Terminal ส่วนกลุ่มของ ANK พบที่บริเวณ N-Terminal ของโปรตีน เมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *AdZFP1* ในราก ลำต้นและใบข อง *Artemisia desertorum* โดยชักนำให้อยู่ในภาวะขาดน้ำ พบว่ายีน *AdZFP1* มีการแสดงออกมากในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ซึ่งการแสดงออกของยีนนี้มีผลไปกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์ฮอร์โมน ABA นอกจากนี้ความเค็มและอุณหภูมิก็กระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นด้วย

จากการวิเคราะห์หายีนที่มีบทบาทสำคัญต่อผลผลิตของยางพาราโดยเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของยีนในน้ำยางระหว่างสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง (RRIT251, RRIM600) และสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตต่ำ (BPM3, KRS138) โดยเทคนิค cDNA-AFLP ได้ Transcription-Derived Fragment (TDF) ของยีนที่แสดงออกมากในยางกลุ่มสายพันธุ์ให้ผลผลิตสูงและมีการแสดงออกน้อย

ในกลุ่มสายพันธุ์ให้ผลผลิตต่ำจำนวน 5 ยีน ในจำนวนนี้มี TDFEP241 ขนาด 242 bp มีลำดับเบส Homology กับยีน *Capsicum annuum* Ankyrin-Repeat Domain C_3H Zinc Finger Protein (*CaKR1*) มีค่า E-value เท่ากับ $3e^{-16}$ เมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีน TDFREP241 ในน้ำยางของยางพารากลุ่มสายพันธุ์ให้ผลผลิตสูงและให้ผลผลิตต่ำโดยเทคนิค sqRT-PCR พบว่ามีการแสดงออกมากในกลุ่มสายพันธุ์ให้ผลผลิตสูงและมีการแสดงออกน้อยในสายพันธุ์ให้ผลผลิตต่ำซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค cDNA-AFLP (Suwanmanee, et al. 2007 : 255, อาดีหละ เจะเมาะ . 2551 : 52)

3.0 การโคลนยีนโดยเทคนิค Rapid Amplification cDNA Ends (RACE)

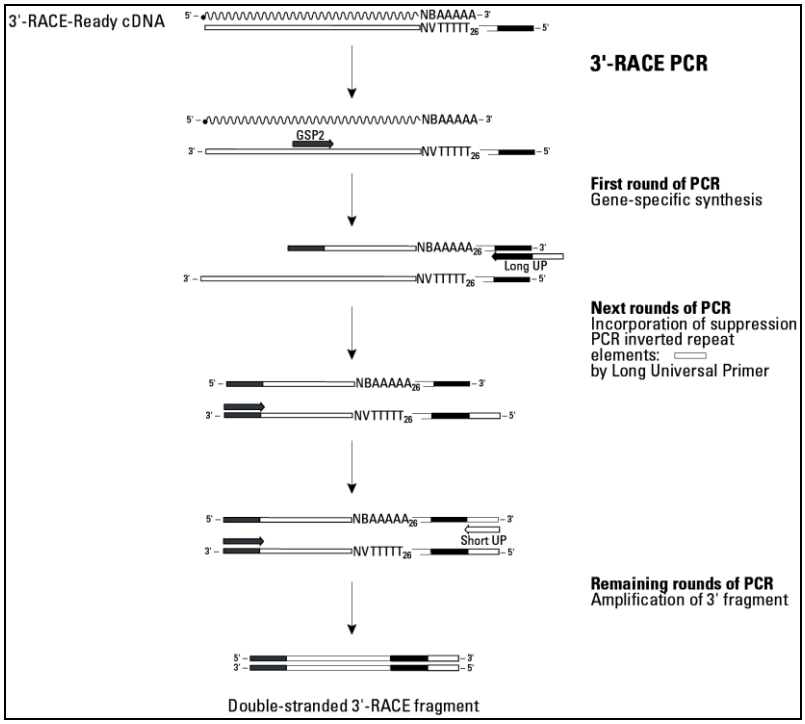
RACE เป็นเทคนิคทางชีวโมเลกุล ที่ใช้ในการหาลำดับเบสที่สมบูรณ์ (Full Length) ของยีนหนึ่งๆ ที่สนใจ โดยการสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA ผ่านกระบวนการ Reverse Transcription และเพิ่มปริมาณ cDNA โดยเทคนิค PCR เทคนิคนี้เป็นเทคนิค ที่เหมาะสมสำหรับใช้หายีนที่ทราบลำดับเบสเพียงบางส่วน การสังเคราะห์ cDNA สามารถทำได้เพียงด้านใดด้านหนึ่งเท่านั้นคือด้าน 5' RACE-PCR หรือ 3' RACE-PCR ของ mRNA บางครั้งจึ งเรียกวิธีการนี้ว่า One-Sided PCR หรือ Anchored PCR'

วิธีการสำหรับเพิ่มปริมาณ cDNA ของ 5' RACE-PCR และ 3' RACE-PCR แตกต่างกันดังนี้

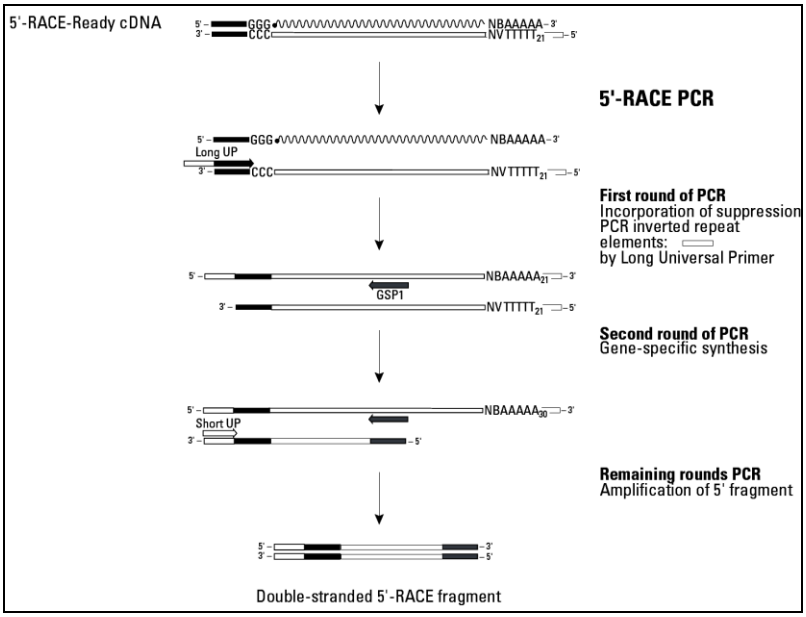
- 3'RACE-PCR เริ่มจากการสังเคราะห์ cDNA สายแรกโดยใช้เอนไซม์ Reverse Transcriptase (RT) มีเบส T สายสั้นๆ ต่อกับ 3' cDNA Synthesis (3'CDS) หรือ Anchor Base เป็นไพรเมอร์ (Anchor Base คือ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นโดยมีลำดับเบสที่เป็นบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2-3 ชนิด เพื่อใช้ในการต่อชิ้นดีเอ็นเอที่ได้กับ Vector ในภายหลัง) เมื่อได้ cDNA สายแรกแล้วจึงย่อยอาร์เอ็นเ อต้นแบบออกไปโดยใช้เอนไซม์ RNase H แล้วเพิ่มปริมาณ cDNA สายเดี่ยวที่ได้โดยวิธี PCR ใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ Anchor Primer กับไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับบริเวณส่วนกลางของยีน ผลผลิตที่ได้คือ บริเวณปลาย 3' ของยีนที่ต้องการ (ภาพที่ 9)

- 5' RACE-PCR เริ่มโดยสังเคราะห์ cDNA สายแรกด้วยเอนไซม์ Reverse Transcriptase โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ (Internal Antisense Primer) เติมเบส A เข้าที่ปลาย 3' โดยใช้เอนไซม์ Terminal Transferase (TdT) ย่อยอาร์เอ็นเอออกโดยใช้เอนไซม์ RNase H แล้วเพิ่มปริมาณ cDNA ที่ได้โดยเทคนิค PCR ใช้ไพรเมอร์ ที่จำเพาะร่วมกับ Anchor Primer (ไพรเมอร์ที่มีส่วนของบริเวณ

จดจำของเอนไซม์ 2-3 ชนิดต่ออยู่กับเบส T สายสั้นๆ) จะได้ชิ้นดีเอ็นเอจากบริเวณปลาย 5' ของยีน ถึงส่วนของไพรเมอร์ที่ใช้ (ภาพที่ 10) (สุรินทร์ ปียะโชคณากุล, 2548 : 121)



ภาพที่ 9 การเพิ่มปริมาณของสาย 3' RACE cDNA (ที่มา : Clontech, 2007 : 29)



ภาพที่ 10 การเพิ่มปริมาณของสาย 5' RACE cDNA (ที่มา : Clontech, 2007 : 28)