

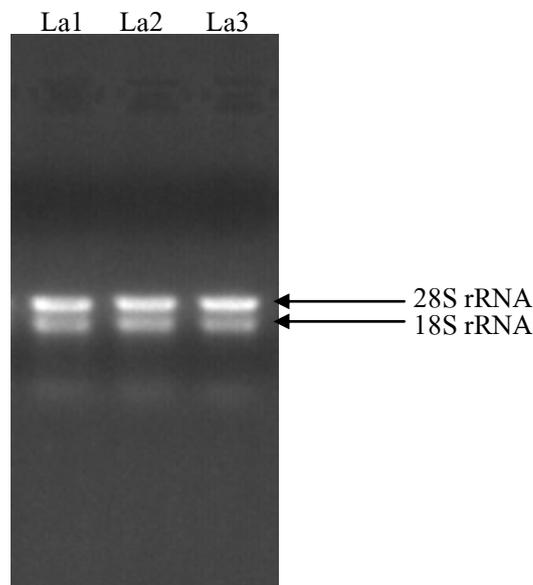
บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การโคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน *HbKR1* ในยางพาราโดยเทคนิค RACE

4.1.1. การเตรียม Total RNA จากน้ำยางพารา

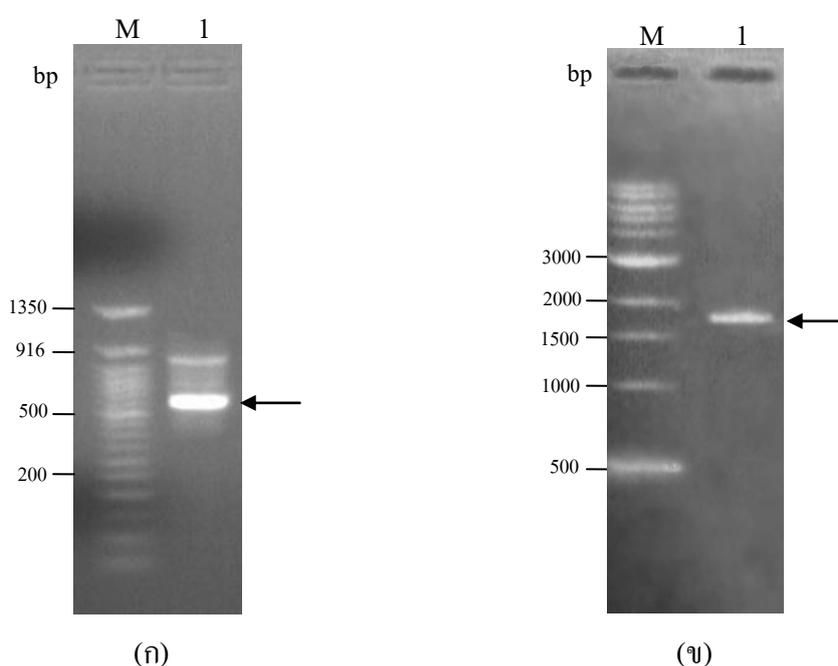
จากการเตรียม Total RNA ในน้ำยางพาราสายพันธุ์ RRIM600 โดยประยุกต์วิธีการของ Fu, et al. (2004 : 197e) เมื่อนำ Total RNA ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ จากอัตราส่วนระหว่าง OD_{260}/OD_{280} พบว่ามีค่าเท่ากับ 1.96, 1.99, 2.05 และตรวจสอบ Integrity ด้วยการทำ Electrophoresis ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วย EtBr (0.1 mg/ml) พบว่าแถบ 18S และ 28S rRNA แยกกันอย่างชัดเจน ไม่ปรากฏลักษณะเป็นปื้นที่เกิดจากการย่อยของเอนไซม์ RNase (ภาพที่ 12) แสดงว่า Total RNA มีความเหมาะสมที่จะใช้สังเคราะห์ First-Strand cDNA เพื่อเพิ่มปริมาณ ยีน *HbKR1* ต่อไป



ภาพที่ 12 Agarose Gel Electrophoresis ของ Total RNA จากน้ำยางพาราสายพันธุ์ RRIM600 (La1: Latex1, La2: Latex2, La3: Latex3)

4.1.2. การเพิ่มปริมาณ cDNA ของยีน *HbKR1* ในน้ำยาราดด้วยเทคนิค RACE

จากการเพิ่มปริมาณ cDNA ของยีน *HbKR1* ทางด้านปลาย-3' และปลาย-5' ด้วยเทคนิค RACE โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสจำเพาะกับยีน *HbKR1* ด้านปลาย-3' (3' GSP2) และด้านปลาย-5' (5' GSP1) ร่วมกับ UPM (Universal Primer A Mix) หรือ NUP (Nested Universal Primer A) จากนั้นนำ PCR Product ไปทำ Electrophoresis ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วย EtBr (0.1 mg/ml) พบว่ามีแถบ cDNA ด้านปลาย 3' ขนาดประมาณ 500 คู่เบส (bp) และปลาย 5' ขนาดประมาณ 1800 คู่เบส (ดังภาพที่ 13ก และ 13ข) ตามลำดับ



ภาพที่ 13 Agarose Gel Electrophoresis ของ First-Strand cDNA ที่ได้จากเทคนิค RACE

(ก) ด้านปลาย-3' ใช้เครื่องหมาย DNA ขนาด 50 คู่เบส (50 bp DNA Ladder)

(ข) ด้านปลาย-5' ใช้เครื่องหมาย DNA ขนาด 1 กิโลเบส (1 kb DNA Ladder)

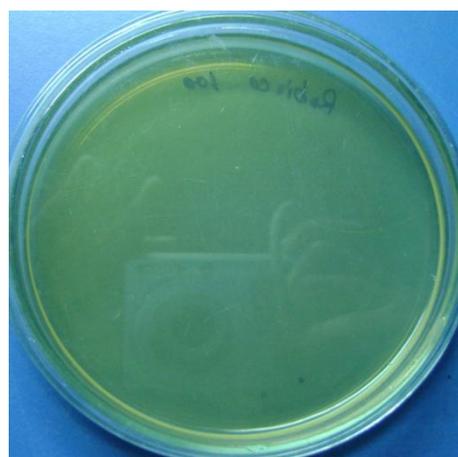
4.1.3. การทำ TA cloning และการคัดเลือกโคลนี

หลังจากแยก cDNA ของยีน *HbKR1* ออกจากเจลอะกาโรสแล้ว จึงนำ cDNA ที่ได้เชื่อมต่อเข้ากับ pGEM[®]-T Easy Vector โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA Ligase ได้เป็นดีเอ็นเอสายผสม (Recombinant DNA) จากนั้น นำดีเอ็นเอสายผสมถ่ายโอน (Transformation) เข้าสู่เซลล์ *E.coli* (DH₅ α) ด้วยวิธี Heat-Shock แล้วนำมาเลี้ยง บนอาหารแข็ง LB ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ Ampicillin ความเข้มข้น 100 mg/ml และสาร IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactoside) ซึ่งเป็นสารที่ชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ β -Galactosidase พร้อมกับสาร X-gal (5-Bromo-4-chro-3-indolyl-

β -D-Galactoside) ซึ่งเป็น ซับสเตรท (Substrate) ของเอนไซม์ β -Galactosidase ทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีดีเอ็นเอสายผสม ซึ่งสังเกตได้จากลักษณะการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Ampicillin ของเซลล์แบคทีเรียและกิจกรรมของ เอนไซม์ β -Galactosidase โดยเซลล์ที่ได้รับ พลาสมิดที่ไม่ใช่ ดีเอ็นเอสายผสม จะเจริญบนอาหารที่มียา ปฏิชีวนะ Ampicillin ได้ และสามารถสร้างเอนไซม์ β -Galactosidase ไปย่อยสาร X-gal เกิดเป็นสารสีฟ้า ทำให้โคโลนีดังกล่าวมีสีฟ้า ส่วนเซลล์ที่มีดีเอ็นเอสายผสม สามารถ เจริญบนอาหารที่ มียาปฏิชีวนะ Ampicillin แต่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ β -Galactosidase จึงไม่มีการย่อยสาร X-gal โคโลนีที่ได้จึงไม่เกิดสี สำหรับเซลล์ที่ไม่ได้รับพลาสมิดจะไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin ได้ จากการศึกษาพบว่า เมื่อเลี้ยงเซลล์ *E.coli* ที่ผ่านการถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมสามารถเจริญบนอาหารที่มียา ปฏิชีวนะ Ampicillin ได้ ซึ่งมีทั้งโคโลนีสีขาวและโคโลนีสีน้ำเงิน (ภาพที่ 14) จากนั้นจึงเลือกโคโลนีสีขาวมาเตรียมพลาสมิดต่อไป



(ก)

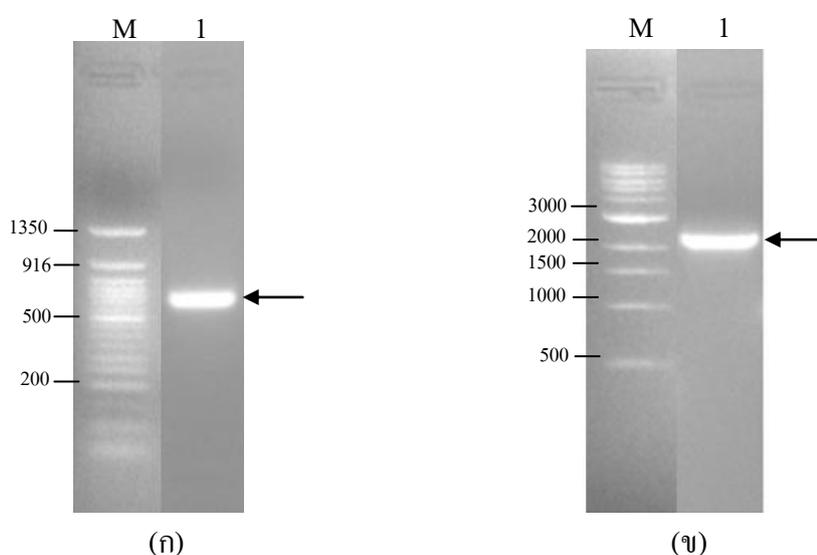


(ข)

ภาพที่ 14 (ก) การเกิดโคโลนีสีขาวของเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่เป็นดีเอ็นเอสายผสม และโคโลนีสีฟ้าของเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่ไม่เป็นดีเอ็นเอสายผสม
(ข) เซลล์ที่ไม่ได้รับพลาสมิดที่เป็นดีเอ็นเอสายผสมไม่เจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin

4.1.4. การเตรียมพลาสมิด

หลังจากคัดเลือกโคโลนีและนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB แล้วจึงนำเซลล์แบคทีเรียที่ได้ไปเตรียมพลาสมิดโดยใช้ QIAprep Spin Miniprep Kit จากนั้นตรวจสอบยืนยันเป้าหมายโดยนำพลาสมิดที่เตรียมได้ไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ใช้ Primer สำหรับทำ RT-PCR หรือ M13 Forward และ M13 Reverse นำ PCR Product มาทำ Electrophoresis ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วย EtBr (0.1 mg/ml) ผลปรากฏว่าโคโลนีที่ได้เลือกมีแถบเป้าหมายที่คาดว่าเป็นแถบของยีน *HbKRI* (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 Agarose Gel Electrophoresis ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณพลาสมิด เพื่อตรวจสอบแถบเป้าหมาย (ก) ด้านปลาย 3' ใช้เครื่องหมาย DNA ขนาด 50 คู่เบส (50 bp DNA Ladder)
 (ข) ด้านปลาย 5' ใช้เครื่องหมาย DNA ขนาด 1 กิโลเบส (1 kb DNA Ladder)

4.1.5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *HbKRI*

จากการเพิ่มปริมาณ cDNA ของยีน *HbKRI* ในบางพาราบริเวณด้านปลาย 3'RACE และ 5'RACE เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน *HbKRI* ที่ได้ทั้งหมด มีขนาด 2,596 คู่เบส ประกอบด้วยส่วนที่แปล รหัส (Open Reading Frame, ORF) จำนวน 2,106 คู่เบส เป็นรหัสกรดอะมิโน 701 Residues มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 72.52 กิโลดาลตัน มี ค่า pI (Isoelectric Point) เท่ากับ 5.60 และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เป็นรหัสกรดอะมิโน ด้านปลาย 5' (5' Un-translated Region หรือ 5' UTR) จำนวน 204 คู่เบส และด้านปลาย 3' (3' Un-translated Region หรือ 3' UTR) จำนวน 286 คู่เบส บริเวณ 5' UTR จะพบ AC Rich Consensus Sequence (ATTTCGATGTGC) ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 199-209 ส่วน 3' UTR จะพบ AU Rich Element Motif, ARE (ATTTA) ที่ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 2,388-2393 พบ Polyadenylation Site (AATAAA) ที่ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 2,440-2,446 และส่วนของ Poly A Tail เท่ากับ 58 คู่เบส (ภาพที่ 16)

5' acatgggggcccccaaaaaccggttaaaggaggagaagccaatagtcttttcctc
tctctgggttctgtgtagttaaaacttcaaagtgaagggtaaaactcaagaacttta
taagccagaacttttgctggtgctctcatttttgcatttaataaagaaaaaaagg
gagttcgaacaaggcctgataaaggagaaacatttcgatgtgcagtggggtcaaagaca
M C S G S K T
ccaactcattctggtttcatcatggagaagaatgaatttcaacgacaagatggggtt
P T H S G F I M E K N E F Q R Q D G F
tgctgtgatctctcttttctgcttgaattgtctgcctcgaatgatcttattggggtt
C C D L S E L L E L S A S N D L I G F
aagagagaaattgaaggaggccgtgacgttgatgagccaggccttatgggtatgggaga
K R E I E G G R D V D E P G L W Y G R
agaattggctcaaaaaacatgggggttgaggagaggacaccctcatgattgctgcc
R I G S K N M G F E E R T P L M I A A
ttacttggaggcaaagatgtcttgaattatatcttggaaatgggcccgtgttgatgtt
L L G G K D V L N Y I L E M G R V D V
aataggtgttggtgctgatgggggtcacagcccttactgtgctggtgcaggtggc
N R C C G S D G V T A L H C A V A G G
tctgcatcttctcttgaggttgtcaagctcttgcttgcgcctctgctgatcataat
S A S S L E V V K L L L A A S A D H N
gctggtgatgccaatggaatcatgctattgatttgcttggttccagttggttaattct
A V D A N G N H A I D L L V P V V N S
ggttttaatttgaggagaaaggcactagagcttgtgctaaagggtggttatactaga
G F N L R R K A L E L V L K G G Y T R
gatgaatcttgtggtttggctgatctgaatcctgatgaaatagatgggcaagaacag
D E S C V L A D L N P D E I D G Q E Q
ctggaagtttcaacaccaatattatctaaagatgggactgagaagaaggaatctct
L E V S T P I L S K D G T E K K E Y P
gttgatctcactcttctgatatacaagaatggtatatttggtactgatgaatttaga
V D L T L P D I K N G I F G T D E F R
atgtatacatttaagggtgaagccttgcctcaagggcatattcccatgattggacagag
M Y T F K V K P C S R A Y S H D W T E
tgcccatttgttcaccctggagagaatgagggcgagatccaaggaaataccat
C P F V H P G E N A R R R D P R K Y H
tatagctgtgtcccatgccctgagtttcgaaaggggtcatgcaggcagggtgatgct
Y S C V P C P E F R K G S C R Q G D A
tgtgaatatgcacatggtatttttgagtgtgcttccacctgctcaatatcgaaca
C E Y A H G I F E C W L H P A Q Y R T
cgtctttgcaaagacgagacaaattgcacaagaagggtttggttctttgctcacaag
R L C K D E T N C T R R V C F F A H K
cctgaagagcttcgccccttgatgcctcaacgggttcgggttgcttccaccaaga
P E E L R P L Y A S T G S V V P S P R
tccttctcagccaatggttcagcactggacatgggttctgtcagtcacttgcctt
S F S A N G S A L D M G S V S P L A L
ggttctccacctgtcttgataccaccttccatgactccctctgggtcctcatct
G S P P V L I P P T S M T P S G S S S
cctatgggttgatggccaaccagactagtgttgtagcccttatcttgcagcttct
P M V G W P N Q T S V V P P I L Q L P

agtagcaggttgaaatctgctctgagtgctagagatatggatgtagacatggagttg
 S S R L K S A L S A R D M D V D M E L
 cttgggcttgacagtcaccatcgccggcaacaacaattgggtcaatgagattggtttc
 L G L D S H H R R Q Q Q L V N E I G F
 tcgtcaccttccggttggaataatgatttgtccactgcttcagcttttgctgtctca
 S S P S G W N N D L S T A S A F A V S
 ggtgatcgaactttggagttggataggcttgaggagtgaagccaactaaccttgaa
 G D R T L E L D R L G G V K P T N L E
 gatatttttggatctcatgatcctacaattttgcctcaattgcagagactcacagtg
 D I F G S H D P T I L P Q L Q R L T V
 gattccactgtatcccagttacagtctcaaacagggattcagatgtgccagaacata
 D S T V S Q L Q S Q T G I Q M C Q N I
 aaccagaagctccgctcaagctaccctaccaacttctcatcttctcctgtgaggaca
 N Q K L R S S Y P T N F S S S P V R T
 tcatcttttggatttgatccgtctggggtagcggcagcagcagtttgaattcaagg
 S S F G F D P S G V A A A A V L N S R
 tctgctgcctttgcaaagcggagccagagttttattgaacgaaatgccgtgaaccgt
 S A A F A K R S Q S F I E R N A V N R
 catactgggtttttcttcaccaacttcttcaccaactataatgccttctaacttatcg
 H T G F S S P T S S P T I M P S N L S
 gattgggggttccccgatggcaaattggaatgggggtattcaaggagaagagcttaat
 D W G S P D G K L E W G I Q G E E L N
 aaactgcgcaagtctgcttcttttggcattcgaagcaatggcagcagtttggcagca
 K L R K S A S F G I R S N G S S L A A
 ggtgcggtatcaatgcctgcagctcttgatgagccagatgtgtcgtgggtccagttcc
 G A V S M P A A L D E P D V S W V Q S
 tgggtaaaggataaccctcccttgaattctgggcacttgggttttgaggaaacagcag
 W V K D N P P L N S G H L G F E E Q Q
 caacaatgccatcttaactggaggttcagaaatgcttccagcatgggtggagcaa
 Q Q C H L N T G G S E M L P A W V E Q
 ttgtacattgagcaggagcagatgggtggct**taa**aacaacagtagcctacagttggct
 L Y I E Q E Q M V A *
 cctaaaacatttttaactagttattatTTTTTccattttttgaatatttactagttcc
 aacatatacttaggaggaaagaaattgaagaaaggaa**aataaaa**aaaaggaaaagggtc
 cggggagaaaacaaagaagttgggcaggatgatggatatctgctcatcgtgttggtta
 gttaatgatgaatgatagtttcttttcttagttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
 aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 3'

ภาพที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *HbKRI* ซึ่งประกอบด้วยเบส ATG เป็น
 รหัสเริ่มต้น (Start Codon), รหัสหยุด (Stop Codon) คือ TAA, ตำแหน่ง ARE (ATTTA),
 Polyadenylation Site (AATAA) และ Poly A Tail

4.1.6 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ HbKR1 กับพืชชนิดอื่นๆ

เมื่อเปรียบเทียบ ลำดับกรดอะมิโนของ HbKR1 ของยางพารา กับพืชชนิดอื่นในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม ClustalX 2.1 พบว่า HbKR1 ของยางพารา มีบริเวณ Conserved Sequences ที่บ่งชี้ว่าเป็นโปรตีน Ankyrin-Repeat Domain C₃H₁ Zinc Finger Protein เหมือนกับพืชชนิดอื่น โดยมีบริเวณ Conserved Sequences ของโปรตีน Ankyrin Repeat (ANK) จำนวน 72 Residues มีตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโนที่ 73-133 จำนวน 2 Domains อยู่บริเวณด้าน N-Terminal และมีบริเวณ Conserved sequences ของโปรตีน Zinc Finger (ZFP) ชนิดที่มีกรดอะมิโน Cysteine 3 Residues และ Histidine 1 Residues (Cx8Cx5Cx3H) อยู่บริเวณตำแหน่งของ กรดอะมิโน ที่ 275-297 เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ HbKR1 ของยางพารากับ KR1 ของพืชชนิดอื่นๆ พบว่า Homology กับลำดับกรดอะมิโนของ *Ricinus communis*, *Capsicum annum*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* และ *Medicago truncatula* เท่ากับ 81.2%, 56.6%, 54.5%, 43.3% และ 39.4% ตามลำดับ (ภาพที่ 17)


```

Hevea      NNDLSTASAFVSG-DRTLELDRLGGVKPTN-----LEDIFGSHDPTILPQLQRLTVDS 503
Capsicum   NGSSAKAATFATSFNDLNGELGRHGGLEPTN-----LDDILATLDSKILSQLQGLSLDA 501
Ricinus    NNGLSTSSAFAASSDRGTGELHRLGGVKPTN-----LEDIFGSLDPSILPQLQGLSVDA 506
Arabidopsis NN-TPMSSPFGSGKGMNRLAG---GAMSPVNS-----LSDMFGTEDN----- 449
Medicago  VGRSGRPKTLTPSNLDDLFCAEIASSPRYSDFPAAASVFSPTHKSAVFNQFQQQLQSS-LSP 592
Oryza      GNHTSRTKSLNPSNLDDLFSAEVMSVSPRYSNADQGGMFSPSHKAAFNLNQQFQQQQALLSP 546
.          . . : . : . . : . . : . . :
Hevea      TVSQLQSQTGIQMCQNINQKLRSSYPNTNFSSSP-VRTSS-FGFDPSGVAAAVALNSRSAA 561
Capsicum   VSPHLQSPKGMQMRQNMNQHMTSYSSGQSSPS-FRTSSSYGIDASIAAATAASSRSAA 560
Ricinus    TSSQLQSPGTGIRQININQKLRSSYPNTNFSSSP-VRPSS-FGIDPSGAAAAVLTSRSA 564
Arabidopsis -----TSQLQIRRSVINPQLHSNS--LSSSP-VGANSLFSMDSS-----AVLASRAE 494
Medicago  INTNVMSPTNVE-----HPLFHQASYGLSSPGRMSPRMSMEALSPMSRSL-FAFAQREKQ 645
Oryza      INT-VFSPKVDNQQLPSSHSLQASLGISSPGRMSPRCSESGSPMNSHLAALAQREKQ 605
. : : . : . . * . . . . . . . *
Hevea      ---FAK-RSQSFIERN-AVNRHTGFS SPTSSPTIMPSNLSDWGS-PDGKLEWGIQGEELN 615
Capsicum   ---FAK-RSQSFIDRS-AVGRLS-----NASAMPSNLSGWGS-PDGKLDWGIQKDELN 607
Ricinus    ---FAK-RSQSFVERS-AVNRHTGFS SPTSSATIMASNFSDWGS-PDGKLDWGIQGEELN 618
Arabidopsis ---FAKQRSQSFIERNNGLNHHF-----AISSMTTTC LNDWGS-LDGKLDWSVQGDDELQ 544
Medicago  QQQQQQLRSLSSRELG--ANNPLS-----AVGSPVN-SWSKWGSSPIGKADWSVNPNDFG 697
Oryza      ---QQTMRSLSSRDLGPSAARASG-----VVGSPPLSSWSKWGS-PSGTPDWGVNGEELG 656
* * * . . . : . . * * * * . : * : :
Hevea      KLRKSASFGRSNGSSLAAGAVS--MPAALDEPDVSWVQSWVKDNPPLNSGHGLGFEEQQQ 673
Capsicum   KLRKSASFGLRNSGNRFPTEGSS--VSDSSVESDVSWVQP--LDSP---ARQLAMEDQQY 660
Ricinus    KLRKSASFGRNNGG-AGAAATS--LPATLNAPDVSWVQSLVKDAPSTSPRQLGFEEQQQ 675
Arabidopsis KLRKSTSFRLR--AGGMESRLPN--EGTGLEEPDVSWVEP-----LVKEPQET 588
Medicago  QTQRSTSFHEGNNGEEPVDGWVHSLVKDPTPEK----KEKLAGSGP----IPSVKKNPNP 749
Oryza      KLRSSSFELRSGDDPDLWSVHTLVKESPEKQVTTAESINSVGPSPMLPPSVSNGEGP 716
: : * : * * . . . : . . :
Hevea      Q---CHLNTGGSEMLPAWVEQLYIEQEQMVA-- 701
Capsicum   R---LNASRG-SEATPTWVDQLYMEQEIVH-- 687
Ricinus    ---CHLNTGNSEIFPAWVEQLYIEQEQMVA-- 702
Arabidopsis -----RLAPVWMEQSYMETEQTVA-- 607
Medicago  ---QADGIDHS-VLGAWLEQLQLDQLVV---- 773
Oryza      SLNAPLDGHDQAAVIGALLEQMLDQHIGSLAT 749
. : : * : :

```

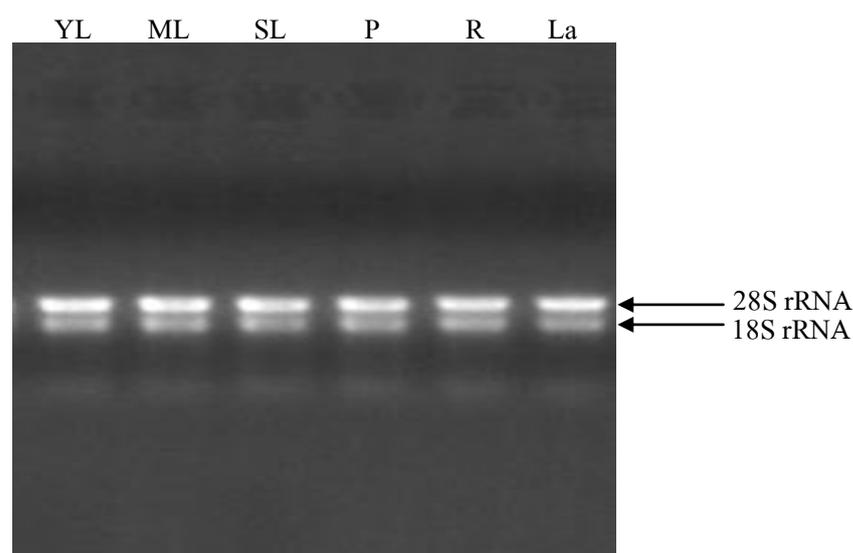
ภาพที่ 17 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน HbKR1 ของยางพารากับพืชชนิดอื่นๆ ในฐานข้อมูล NCBI ประกอบด้วย *Capsicum annuum* (DQ862464), *Ricinus communis* (XM_002525609.1), *Arabidopsis thaliana* (NP200670.2), *Medicago truncatula* (ABE84364.2) และ *Oryza sativa* (XP69392)

4.2 การแสดงออกของยีน *HbKR1* ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของกล้ายางพาราสายพันธุ์

RRIM600

4.2.1. การเตรียม Total RNA

จากการเตรียม Total RNA ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของต้นกล้ายางพาราสายพันธุ์ RRIM600 อายุ 3 เดือน ได้แก่ ใบอ่อน ใบเจริญเต็มที่ ใบแก่ ก้านใบ รากและน้ำยาง โดยใช้วิธีการเดียวกันกับข้อ 4.1.1 เมื่อนำมาวิเคราะห์ ความบริสุทธิ์ จากอัตราส่วนระหว่าง OD_{260}/OD_{280} เท่ากับ 1.82, 1.84, 2.00, 1.80, 2.00 และ 1.99 ตามลำดับ จากนั้นนำ Total RNA ไปวิเคราะห์ Integrity ด้วยการทำให้ Electrophoresis ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วย EtBr (0.1 mg/ml) พบว่าแถบ 18S และ 28S rRNA แยกกันอย่างชัดเจน ไม่ปรากฏลักษณะเป็นปื้นที่เกิดจากการย่อยของเอนไซม์ RNase (ภาพที่ 18)

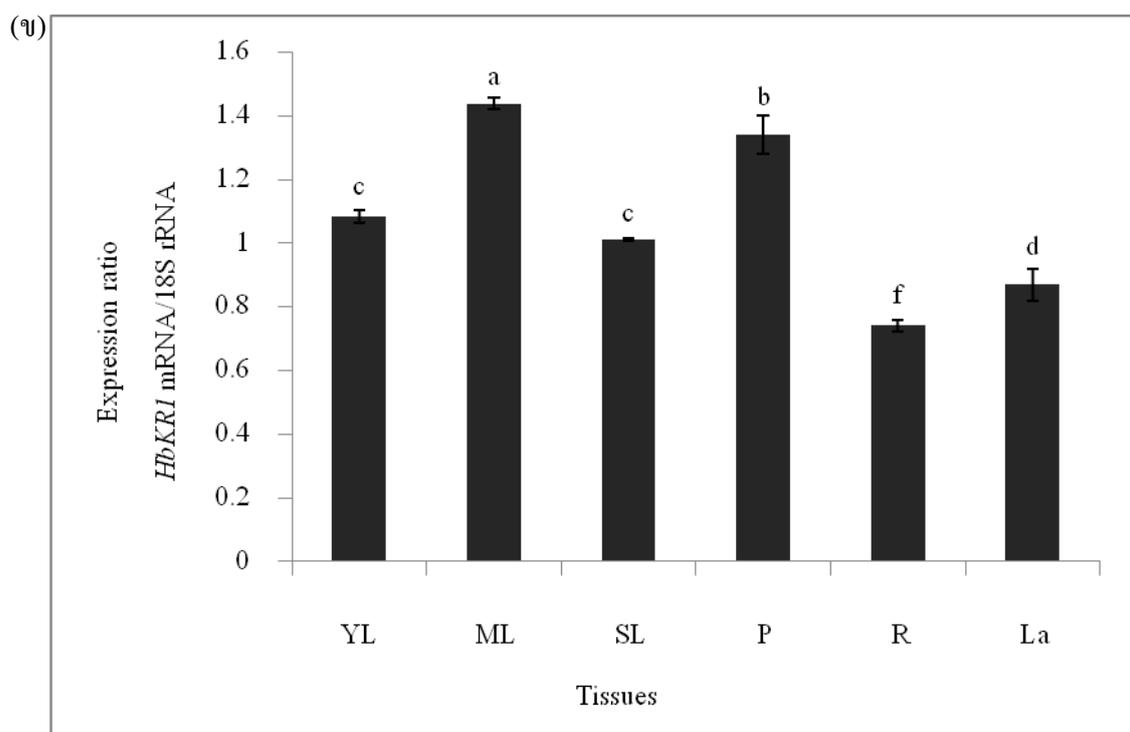
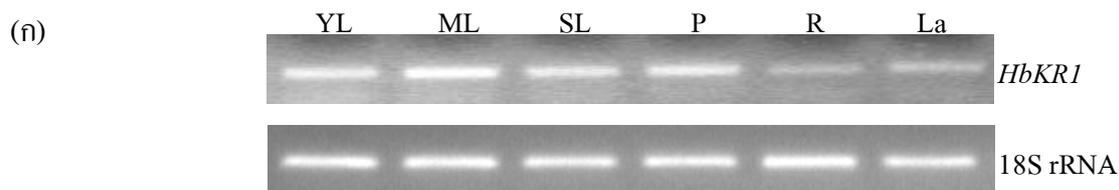


ภาพที่ 18 Agarose Gel Electrophoresis ของ Total RNA จากเนื้อเยื่อใบอ่อน (Young Leaves: YL) ใบเจริญเต็มที่ (Mature Leaves: ML) ใบชราภาพ (Senescence Leaves: SL) ก้านใบ (Petioles: P) ราก (Roots: R) และน้ำยาง (Latex: La) ของต้นกล้ายางพาราสายพันธุ์ RRIM600

4.2.2. การแสดงออกของยีน *HbKR1* ในเนื้อเยื่อต่างๆ

เมื่อวิเคราะห์ การแสดงออกของ ยีน *HbKR1* ในเนื้อเยื่อ ต่างๆ โดยนำ RT-PCR Product ของยีนไปทำ Electrophoresis ในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และวัดความเข้มของแถบ (Intensity) cDNA ของยีน *HbKR1* และยีน 18S rRNA จากนั้นวิเคราะห์การแสดงผลการ

ขึ้นจากค่าอัตราส่วนระหว่างความเข้มของแถบ cDNA ของยีน *HbKR1* และยีน 18S rRNA พบว่าค่าเฉลี่ย การแสดงออกของ ยีน *HbKR1* ในเนื้อเยื่อต่างๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.0850, 1.4390, 1.0125, 1.3415, 0.7420 และ 0.8695 ตามลำดับ โดยในเนื้อเยื่อใบเจริญเต็มที่ที่มีการแสดงออกสูงที่สุด รองมาเป็นก้านใบ สำหรับ ใบอ่อนและใบชราภาพมีการแสดงออกไม่แตกต่างกัน ส่วนในน้ำยางและรากมีการแสดงออกของยีนน้อย โดยในรากน้อยที่สุด (ภาพที่ 19)



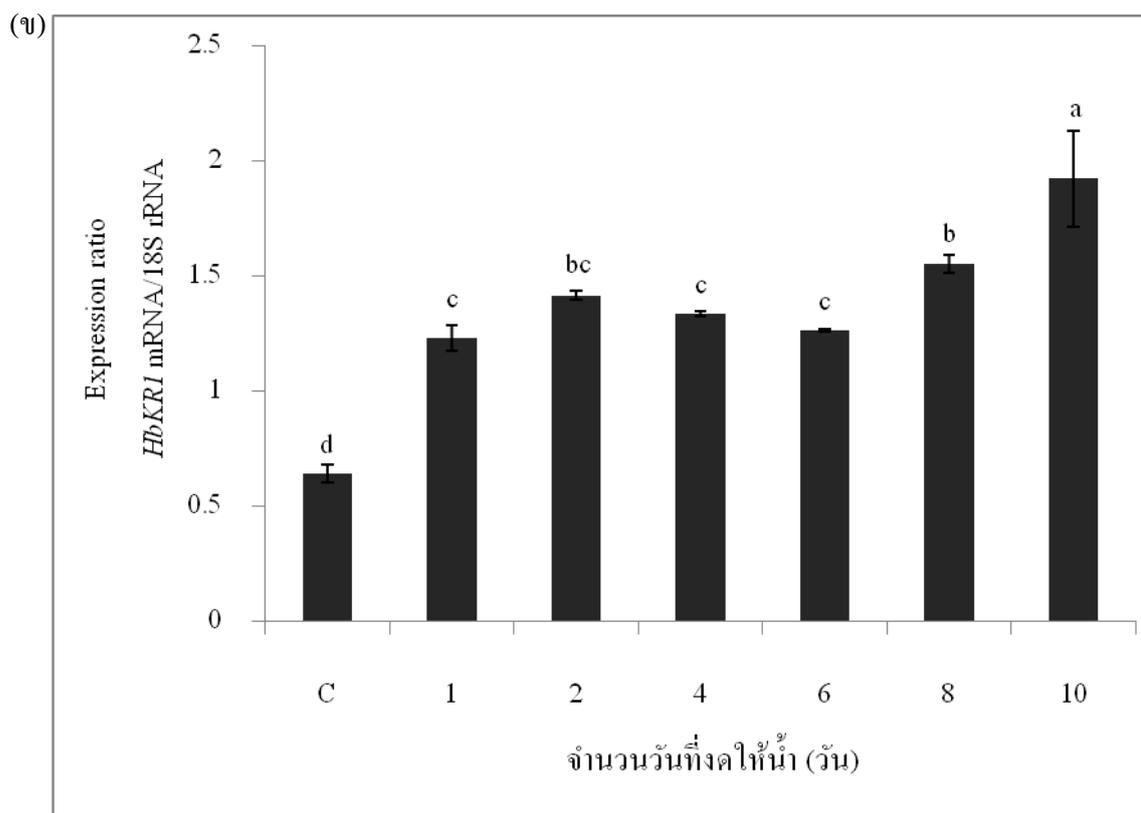
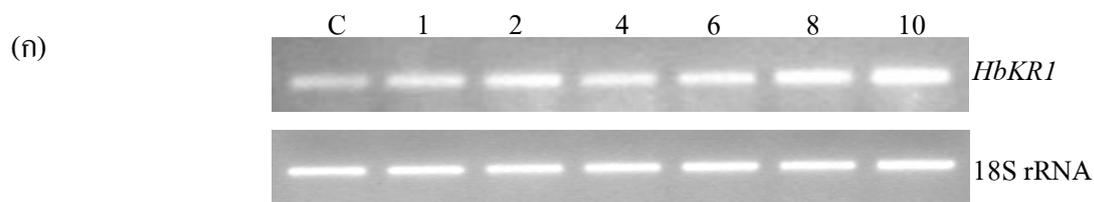
หมายเหตุ อักษร a b c ที่แตกต่างกันในเนื้อเยื่อต่างๆ แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ภาพที่ 19 (ก) Agarose Gel Electrophoresis ของ RT-PCR product ของยีน *HbKR1* และยีน 18S rRNA ในเนื้อเยื่อใบอ่อน (YL) ใบเจริญเต็มที่ (ML) ใบชราภาพ (SL) ก้านใบ (P) ราก (R) และน้ำยาง (La) ของต้นกล้วยพาราสายพันธุ์ RRIM600 (ข) ค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีน *HbKR1* ในเนื้อเยื่อต่างๆ

4.3.2. การแสดงออกของยีน *HbKRI* ในเนื้อเยื่อใบและลำต้น

4.3.2.1 เนื้อเยื่อใบ

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *HbKRI* โดยนำ RT-PCR Product ของยีนไปทำ Electrophoresis ในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และวัดความเข้มของแถบ (Intensity) cDNA ของยีน *HbKRI* และยีน 18S rRNA จากนั้นวิเคราะห์การแสดงออกของยีนจากค่าอัตราส่วนระหว่างความเข้มของแถบ cDNA ของยีน *HbKRI* และยีน 18S rRNA พบว่าค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีน *HbKRI* ในช่วงเวลา ต่างๆ แตกต่างกันอย่างมีนัย สำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.6398, 1.2290, 1.4138, 1.3335, 1.2619, 1.5491 และ 1.9212 ตามลำดับโดยระดับของการแสดงออกสูงขึ้นทันทีหลังจากทิ้งคให้น้ำเป็นเวลา 1 วัน และมีการแสดงออก สูงขึ้น ในระดับใกล้เคียง กันจนถึงวันทิ้งคให้น้ำเป็นเวลา 6 วัน จากนั้นจึงมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในวันที่ 8 และวันที่ 10 ของการงดให้น้ำ เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *HbKRI* ในกลุ่มต้นกล้าที่ยางที่ขาดน้ำเป็นเวลา 10 วันและกลุ่มที่ได้รับน้ำทุกวันเป็นเวลา 10 วัน พบว่า กลุ่มที่ขาดน้ำมีระดับการแสดงออกของยีน *HbKRI* สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับน้ำทุกวันประมาณ 3 เท่า (ภาพที่ 21)

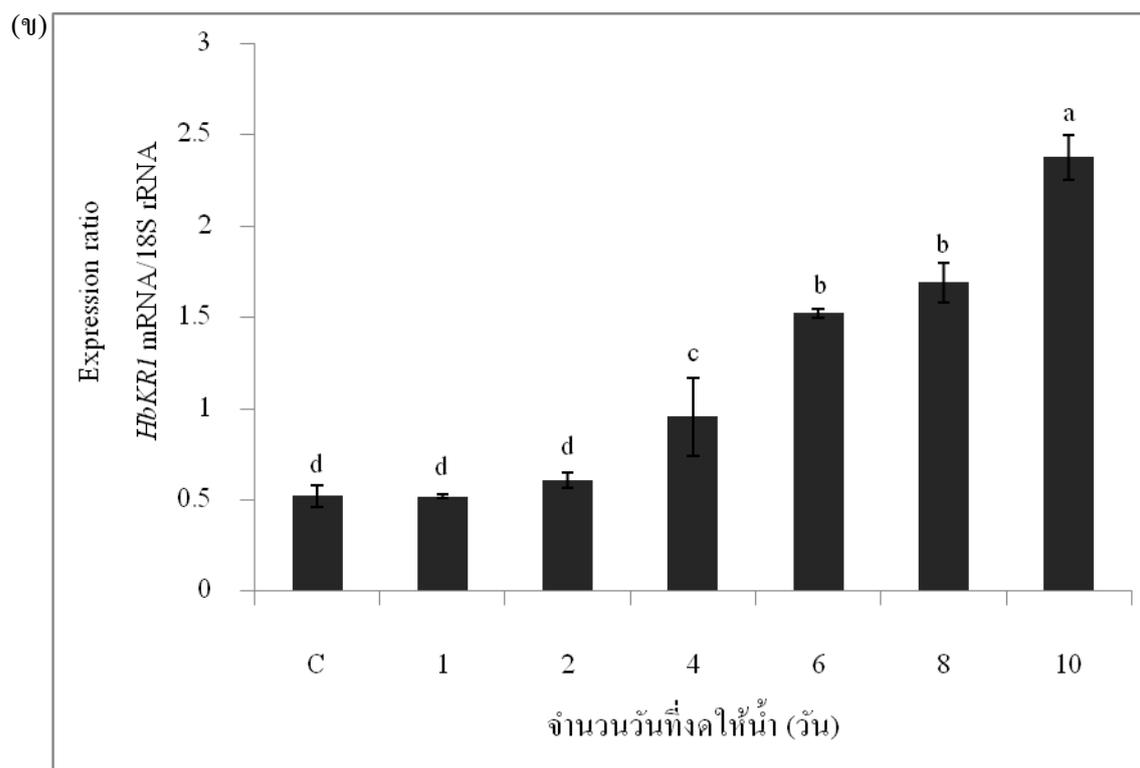
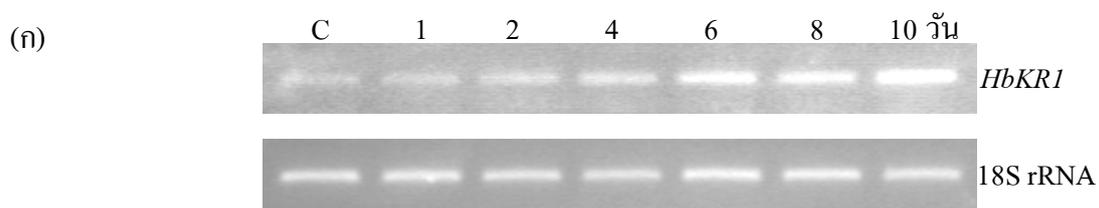


หมายเหตุ อักษร a b c ที่แตกต่างกันของเนื้อเยื่อ ใบที่จมน้ำในเวลาต่างๆ แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ภาพที่ 21 (ก) Agarose Gel Electrophoresis ของยีน *HbKR1* และยีน 18S rRNA ในเนื้อเยื่อใบที่จมน้ำในช่วงเวลาต่างๆ ได้แก่ ได้รับความน้ำทุกวันเป็นเวลา 10 วัน (Control: C) จมน้ำ 1 วัน (1) จมน้ำ 2 วัน (2) จมน้ำ 4 วัน (4) จมน้ำ 6 วัน (6) จมน้ำ 8 วัน (8) จมน้ำ 10 วัน (10) (ข) ค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีน *HbKR1* ในช่วงเวลาต่างๆ

4.3.2.2 เนื้อเยื่อลำต้น

เมื่อวิเคราะห์ การแสดงออกของยีน *HbKRI* ในเนื้อเยื่อลำต้น โดยนำ RT-PCR Product ของยีน ไปทำ Electrophoresis ในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และวัดความเข้ม ของแถบ (Intensity) cDNA ของยีน *HbKRI* และยีน 18S rRNA จากนั้นวิเคราะห์การ แสดงออกของยีนจากค่าอัตราส่วนระหว่างความเข้มของแถบ cDNA ของยีน *HbKRI* และยีน 18S rRNA พบว่ามีค่าเฉลี่ยการแสดงออกของ ยีน *HbKRI* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งมีค่า เท่ากับ 0.5215, 0.5198, 0.6067, 0.9565, 1.5242, 1.6913 และ 2.3778 ตามลำดับ โดยระดับการ แสดงออกของยีนไม่แตกต่างกันหลังจากดให้น้ำ 1 วันและ 2 วันจากนั้นค่อยๆ สูงขึ้นหลังจากดให้น้ำ เป็นเวลา 4 วัน 6 วัน 8 วันและสูงที่สุดหลังดให้น้ำ 10 วัน เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *HbKRI* ในกลุ่มต้นกล้าที่ขาดน้ำเป็นเวลา 10 วันและกลุ่มที่ได้รับน้ำทุกวันเป็นเวลา 10 วัน พบว่า กลุ่มที่ขาดน้ำมีระดับการแสดงออกของยีน *HbKRI* สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับน้ำทุกวัน ประมาณ 4 เท่า (ภาพที่ 22)



หมายเหตุ อักษร a b c ที่แตกต่างกันของเนื้อเยื่อลำต้นที่ขาดน้ำในเวลาต่างๆ แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

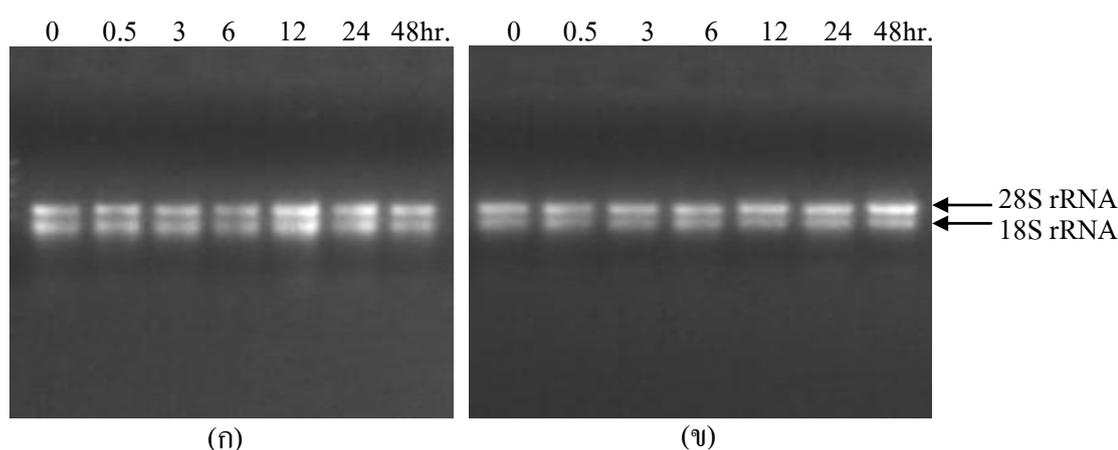
ภาพที่ 22 (ก) Agarose Gel Electrophoresis ของยีน *HbKR1* และยีน 18S rRNA ในเนื้อเยื่อลำต้นที่ขาดน้ำที่ช่วงเวลาต่างๆ ได้แก่ ได้รับน้ำทุกวันเป็นเวลา 10 วัน (Control: C) งดให้น้ำ 1 วัน (1) งดให้น้ำ 2 วัน (2) งดให้น้ำ 4 วัน (4) งดให้น้ำ 6 วัน (6) งดให้น้ำ 8 วัน (8) งดให้น้ำ 10 วัน (10) (ข) ค่าเฉลี่ยการแสดงผลของยีน *HbKR1* ในช่วงเวลาต่างๆ

4.4 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการแสดงออกของยีน *HbKR1* ในเนื้อเยื่อใบและลำต้นของกล้ายางพาราติดตาสายพันธุ์ RRIM600

การวิเคราะห์ผลโซเดียมคลอไรด์ต่อการแสดงออกของยีน *HbKR1* ในเนื้อเยื่อใบและลำต้น โดยใช้กล้ายางพาราติดตาสายพันธุ์ RRIM600 ที่มีอายุ 3 เดือนและวางเลี้ยงไว้ใน ห้องเพาะเลี้ยงกล้า ภายใต้การควบคุมปริมาณสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมตามข้อที่ 4.3 รดน้ำต้นยางด้วยน้ำที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ วางไว้ที่เวลาต่างๆ ได้แก่ 0, 0.5, 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมาเตรียม Total RNA และวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *HbKR1* โดยเทคนิค sqRT-PCR ดังนี้

4.4.1 การเตรียม Total RNA

เมื่อเตรียม Total RNA จากเนื้อเยื่อใบและลำต้น ของกล้ายางพาราที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ วางไว้ที่เวลาต่างๆ คือ 0, 0.5, 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง โดยเมื่อนำมา วิเคราะห์ ความบริสุทธิ์ของ Total RNA จากอัตราส่วนระหว่าง OD_{260}/OD_{280} พบว่า ในเนื้อเยื่อใบมีค่าเท่ากับ 2.06, 2.11, 2.08, 2.08, 2.07, 2.05, 2.09 ส่วนในเนื้อเยื่อลำต้นมีค่าเท่ากับ 2.05, 2.08, 2.02, 2.09, 1.98, 1.97, 1.93 ตามลำดับ จากนั้นนำ Total RNA มาวิเคราะห์ Integrity ด้วยการทำ Electrophoresis ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วย EtBr (0.1 mg/ml) พบว่า แถบ 18S และ 28S rRNA แยกกันอย่างชัดเจน ไม่ปรากฏลักษณะเป็นปื้นที่เกิดจากการย่อยของเอนไซม์ RNase (ภาพที่ 23)

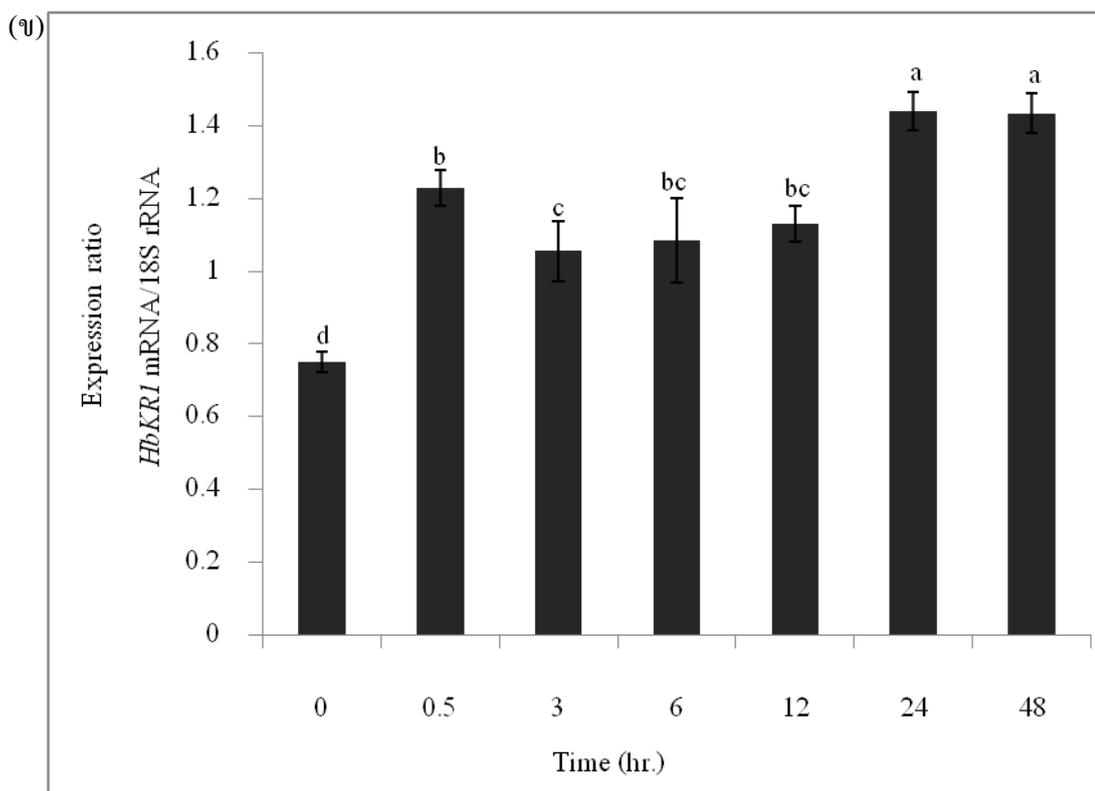
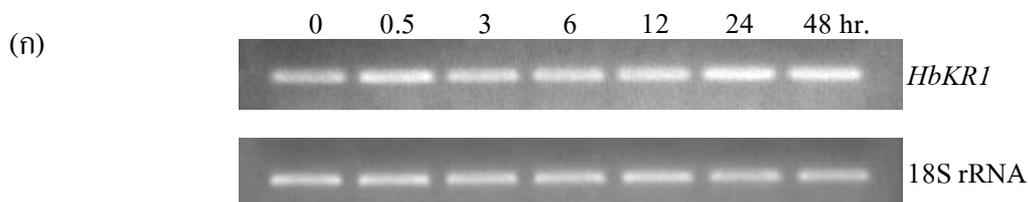


ภาพที่ 23 Agarose Gel Electrophoresis ของ Total RNA จากกล้ายางพาราที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (ก) เนื้อเยื่อใบ (ข) เนื้อเยื่อลำต้น

4.4.2. การแสดงออกของยีน *HbKRI* ในเนื้อเยื่อใบและลำต้น

4.4.2.1 เนื้อเยื่อใบ

เมื่อวิเคราะห์ผลของไซเดียมคลอไรด์ต่อการแสดงออกของยีน *HbKRI* ในเนื้อเยื่อใบ โดยนำ RT-PCR Product ของยีน ไปทำ Electrophoresis ในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และวัดความเข้มของแถบ (Intensity) cDNA ของยีน *HbKRI* และยีน 18S rRNA จากนั้นวิเคราะห์การแสดงออกของยีนจากค่าอัตราส่วนระหว่างความเข้มของแถบ cDNA ของยีน *HbKRI* และยีน 18S rRNA พบว่า ค่าเฉลี่ย การแสดงออก ของยีน *HbKRI* แตกต่างกันอย่าง มีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.7508, 1.2298, 1.0565, 1.0863, 1.1297, 1.4406 และ 1.4349 ตามลำดับ โดยระดับการแสดงออกของยีนจะเพิ่มขึ้นทันทีหลังจากที่ได้รับไซเดียมคลอไรด์ ที่ช่วงเวลา 0.5 ชั่วโมง และแสดงออกอย่างคงที่ใน 3, 6, 12 ชั่วโมง ส่วนในเวลา 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมงพบว่า มีระดับการแสดงออกของยีนสูงที่สุด (ภาพที่ 24)

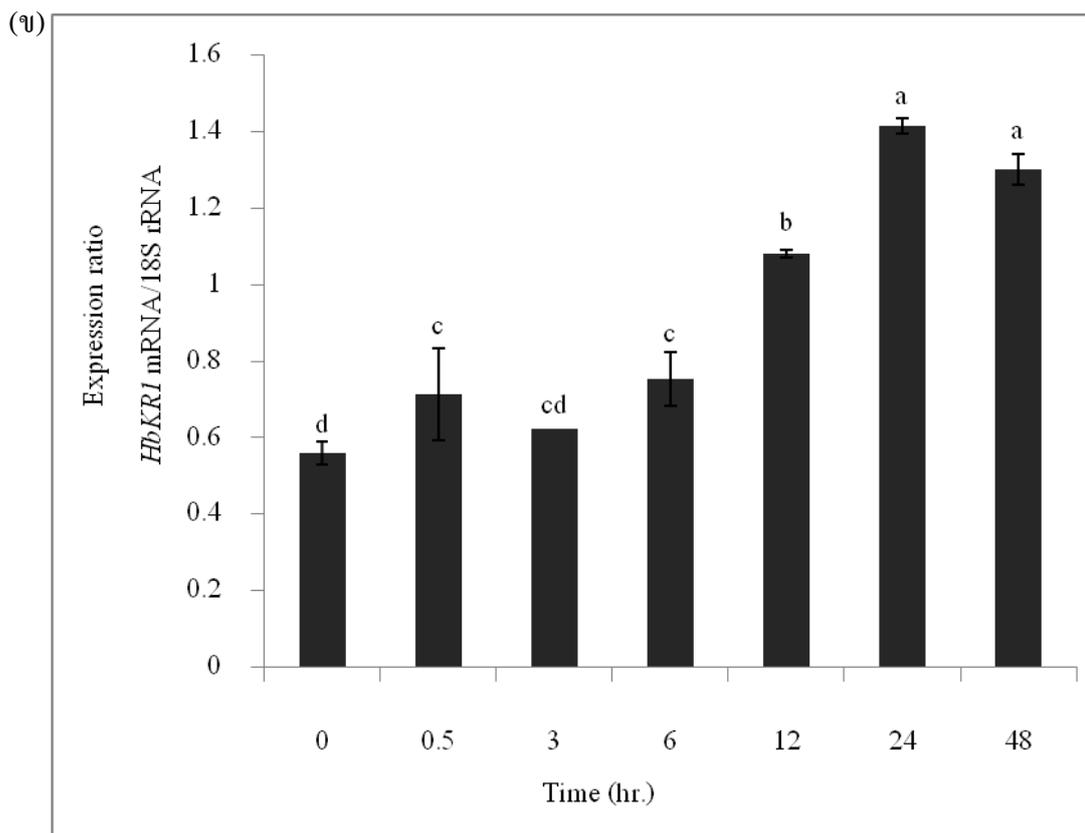
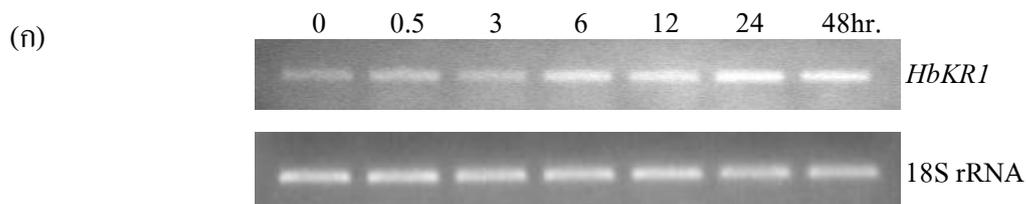


หมายเหตุ อักษร a b c ที่แตกต่างกันของเนื้อเยื่อใบที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ในเวลาต่างๆ แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ภาพที่ 24 (ก) Agarose Gel Electrophoresis ของยีน *HbKR1* และยีน 18S rRNA ในเนื้อเยื่อใบที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ช่วงเวลาต่างๆ ได้แก่ 0, 0.5, 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง (ข) ค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีน *HbKR1* ในช่วงเวลาต่างๆ

4.4.2.1 เนื้อเยื่อลำต้น

เมื่อวิเคราะห์ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการแสดงออกของยีน *HbKR1* ในเนื้อเยื่อลำต้น โดยนำ RT-PCR Product ของยีนไปทำ Electrophoresis ในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และวัดความเข้มของแถบ (Intensity) cDNA ของยีน *HbKR1* และยีน 18S rRNA จากนั้นวิเคราะห์การแสดงผลการแสดงออกของยีนจากค่าอัตราส่วนระหว่างความเข้มของแถบ cDNA ของยีน *HbKR1* และยีน 18S rRNA พบว่า มีค่าอัตราส่วนการแสดงผลการแสดงออกของ ยีน *HbKR1* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.5596, 0.7132, 0.6235, 0.7549, 1.0809, 1.4137 และ 1.3026 ตามลำดับ โดยมีระดับการแสดงออกของยีนสูงขึ้นหลังจากที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์เป็นเวลา 0.5, 3, 6 ชั่วโมง และมีการแสดงออกสูงขึ้นกว่าเดิมในเวลา 12 ชั่วโมง ส่วนในเวลา 24 ชั่วโมงมีระดับการแสดงออกสูงที่สุดและคงที่ในเวลา 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 25)



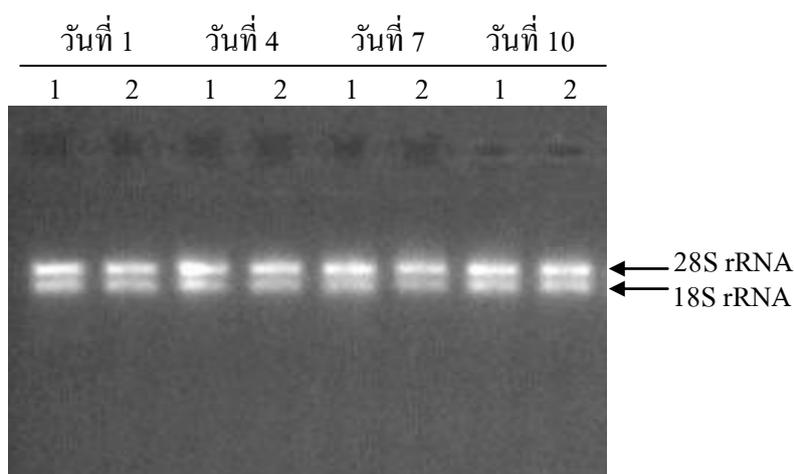
หมายเหตุ อักษร a b c ที่แตกต่างกันของเนื้อเยื่อลำต้นที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ในเวลาต่างๆ แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ภาพที่ 25 (ก) Agarose Gel Electrophoresis ของยีน *HbKR1* และยีน 18S rRNA ในเนื้อเยื่อลำต้นที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ช่วงเวลาต่างๆ ได้แก่ 0, 0.5, 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง (ข) ค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีน *HbKR1* ในช่วงเวลาต่างๆ

4.5 ผลของการกีดต่อการแสดงออกของยีน *HbKR1* ในยางพาราสายพันธุ์ RRIC110

4.5.1 การเตรียม Total RNA

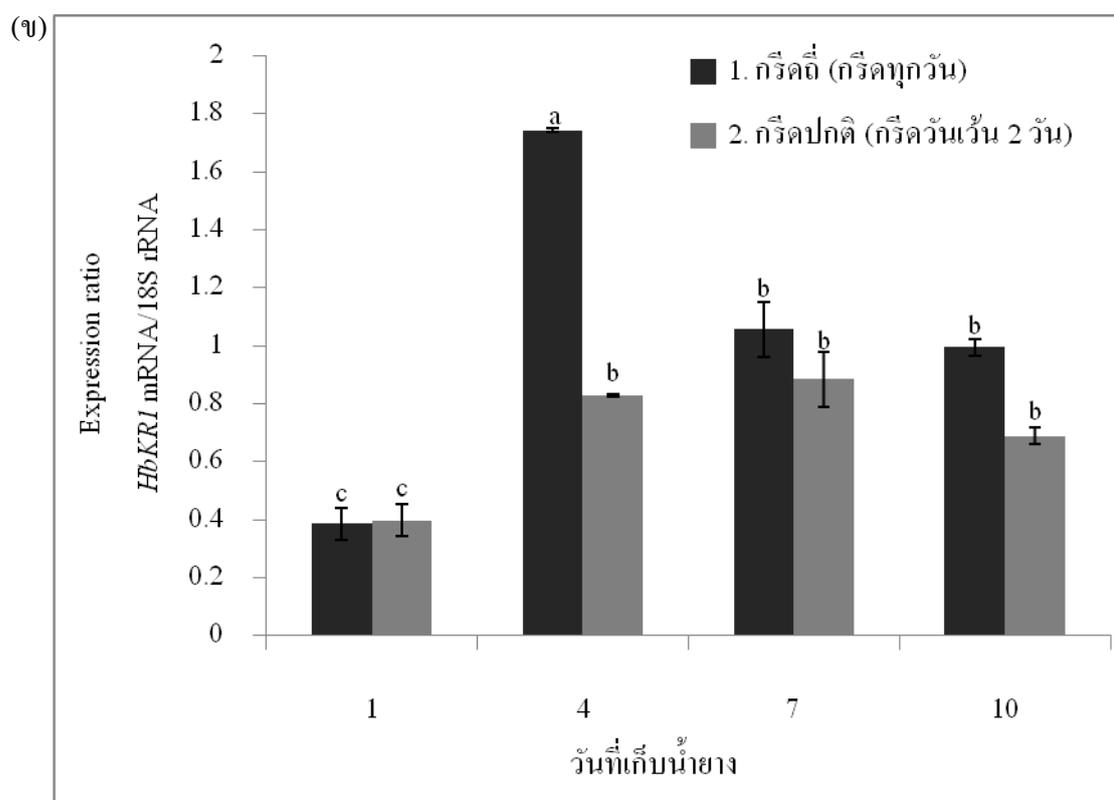
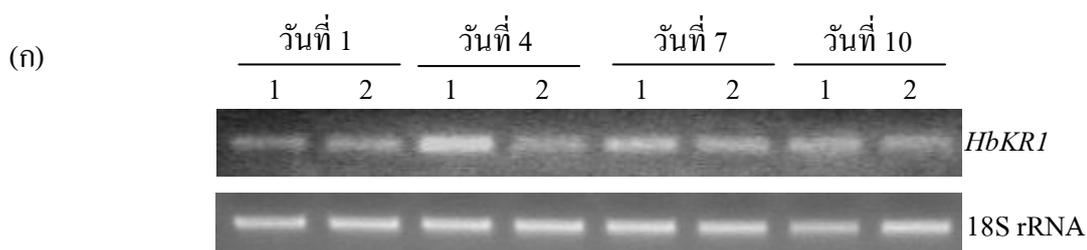
เมื่อเตรียม Total RNA จากน้ำยางพาราที่กรีดยดีและกรีดยปกติ และนำไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์จากอัตราส่วนระหว่าง OD_{260}/OD_{280} ของวันที่ 1 วันที่ 4 วันที่ 7 และวันที่ 10 พบว่ามีค่าเท่ากับ 2.02, 2.05, 2.03, 2.00, 1.92, 1.98, 2.00, 1.82 จากนั้นนำ Total RNA ไปวิเคราะห์ Integrity ด้วยการทำ Electrophoresis ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วย EtBr (0.1 mg/ml) พบว่า แถบ 18S และ 28S rRNA แยกกันอย่างชัดเจน ไม่ปรากฏลักษณะเป็นปื้นที่เกิดจากการย่อยของเอนไซม์ RNase (ภาพที่ 26)



ภาพที่ 26 Agarose Gel Electrophoresis ของ Total RNA จากน้ำยางพาราสายพันธุ์ RRIC110 ที่กรีดยดี (1) และกรีดยปกติ (2)

4.5.2 การแสดงออกของยีน *HbKRI* ในน้ำยางพาราที่กรีดยังและกรีดยอด

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *HbKRI* ในน้ำยางของยางพาราที่กรีดยังและกรีดยอดกับกลุ่มกรีดยอดเป็นเวลา 10 วัน พบว่า ค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีนในกลุ่มที่กรีดยัง ของวันที่ 1 วันที่ 4 วันที่ 7 และวันที่ 10 มีค่าเท่ากับ 0.3849, 1.7429, 1.0556 และ 0.9940 ตามลำดับ ส่วนค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีนในกลุ่มที่กรีดยอดของวันที่ 1 วันที่ 4 วันที่ 7 และวันที่ 10 มีค่าเท่ากับ 0.3970, 0.8274, 0.8853 และ 0.6890 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบ การแสดงออกของยีน ภายในกลุ่มเดียวกัน พบว่ากลุ่มที่กรีดยังมีค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีนในแต่ละวันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยวันที่ 1 มีการแสดงออกของยีนต่ำสุดและเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 4 จากนั้นจึงลดลงในวันที่ 7 และวันที่ 10 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่กรีดยอดมีค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีนในแต่ละวัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวันที่ 1 มีการแสดงออกของยีนต่ำสุด และเพิ่มขึ้นในวันที่ 4 วันที่ 7 และวันที่ 10 ไม่แตกต่างกัน และเมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *HbKRI* ระหว่างกลุ่มที่กรีดยังและกรีดยอดพบว่า วันที่ 1 ค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีนในกลุ่มที่กรีดยังกับกลุ่มกรีดยอด ไม่แตกต่างกัน ส่วนวันที่ 4, 7 และ 10 ค่าอัตราส่วนการแสดงออกของยีนในกลุ่มที่กรีดยังและ กลุ่มที่กรีดยอดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยกลุ่มที่กรีดยังระดับการแสดงออกของยีนสูงกว่ากลุ่มที่กรีดยอด (ภาพที่ 27)



หมายเหตุ อักษร a b c ที่แตกต่างกันในวันต่างๆ แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ภาพที่ 27 ผลของการกรี๊ดดีและกรี๊ดปกติต่อการแสดงออกของยีน *HbKR1*

(ก) Agarose Gel Electrophoresis ของ RT-PCR Product ของยีน *HbKR1* และ 18S rRNA

(ข) ค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีน *HbKR1* ในน้ำยางของกล้วยพาราสายพันธุ์ RRIC110