บทที่ 5
อภิปรายผล สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการศึกษา

5.1.1. การเตรียม Total RNA จากยางพารา

การเตรียม Total RNA เป็นขั้นตอนแรกที่มีความสำคัญในการ โคลนและ วิเคราะห์การแสดงออกของยีน เพื่อให้ได้ Total RNA ที่บริสุทธิ์และมีคุณภาพดี การวิจัยครั้งนี้ได้ปร ะยุกต์ใช้วิธีการของ ฟูและคณะ (Fu, et al. 2004 : 197e) มีสารเคมี บางชนิด ที่เปลี่ยนแปลงไปจากวิธีเดิม ตัวอย่างเช่น Polyethylene Glycol 4000 เป็น Polyethylene Glycol 8000, Tris-HCl (pH 8.5) เป็น Tris-HCl (pH 8.0) และ Isopropylalcohol เป็น 70% Ethanol ซึ่งผลการท ดลองพบว่า Total RNA จากยางพารา ทั้งหมด มีค่า OD_{260}/OD_{280} อยู่ระหว่าง 1.80 – 2.09 ซึ่งใกล้เคียงกับค่า มาตรฐาน (2 ± 0.05) ที่ยอมรับ ได้ว่าเป็น Total RNA ที่มีความบริสุทธิ์ (Farrell. 1993 : 10) นอกจากนี้ Total RNA จากทุกตัวอย่างอยู่ในสภาพ Integrity ไม่ถูกย่อยด้ว ยเอนไซม์ RNase แสดงว่า Total RNA เหมาะสมที่จะนำไปโคลนและวิเคราะห์การแสดงออกของยีนได้

5.1.2. การโคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *HbKR1* ในยางพารา

เมื่อโคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *HbKR1* จากน้ำยางของยางพารา สายพันธุ์ RRIM600 พบว่ามีขนาด 2,596 คู่เบส ประกอบด้วย บริเวณ ที่เป็น รหัสของ กรดอะมิโน จำนวน 2,106 คู่เบส โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ATG เป็นรหัสเริ่มต้นใน การ สังเคราะห์โปรตีน และมีตำแหน่ง Consensus Sequences บริเวณ ATG เป็น ATTTCG**ATG**TGC มี Conserved Nucleotides เป็นนิวคลีโอไทด์ T อยู่ตำแหน่งที่ -3 และตำแหน่งที่ +4 โดยนับจากลำดับนิวคลีโอไทด์ A ของรหัสเริ่มต้น ซึ่ง สอดคล้องกับ *KR1* ของ *Ricinus communis* (AATTCG**ATG**TGC) และ *Capsicum annuum* (AATTCG**ATG**TGC) แต่มีความแตกต่างกับ *KR1* ของ *Arabidopsis thaliana* (TTTGCC**ATG**GGA) และยีนต่างๆ ในพืชชั้นสูง ซึ่งส่วนใหญ่จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น GCCRCC**ATG**G (R หมายถึง A/G) มี Conserved Nucleotides เป็นเบสเพียวรีน โดยเฉพาะนิวคลีโอไทด์ A อยู่ตำแหน่งที่ -3 และ G อยู่ตำแหน่งที่ +4 (Tran. 2010 : 8) ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 3′ ที่ไม่เป็นรหัสของกรดอะมิโนมีขนาด 286 คู่เบส โดยมีตำแหน่งของ AU Rich Element Motif (ARE) อยู่หลังลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงการสิ้นสุดการถอดรหัส (Termination Codon, TAA) ประมาณ 60 คู่เบส มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น ATTTA จากการศึกษาพบว่าตำแหน่ง ARE มีความสำคัญในการกำหนด Stability ของ mRNA (Bakheet, Frevel, Williams, Greer and Khabar. 2001 : 246) นอกจากนี้ยังมี

ตำแหน่ง Polyadenylation Signal มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะเป็น AATAAA ซึ่งเป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ Endonuclease และมี Poly A Tail เป็นโครงสร้างที่ทำให้ mRNA มีความคงตัวมาก ขึ้น ป้องกันการถูกย่อยจากเอนไซม์ Ribonuclease ในขณะที่มีการเคลื่อนย้ายโมเลกุลของ mRNA จากนิวเคลียสไปยังไซโตพลาสซึม โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ AATAAA ของ *HbKR1* อยู่ห่างจาก Poly A Tail เท่ากับ 105 คู่เบส

5.1.3 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ HbKR1 กับ KR1 ของพืช

ยีน *HbKR1* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่เป็นรหัสกรดอะมิโน 701 Residues มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 72.52 กิโลดาลดัน และ pI เท่ากับ 5.60 ซึ่งมีค่าใกล้เคียง กับกรดอะมิโน *KR1* ของ *Ricinus communis* ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 76.10 กิโลดาลดัน และ pI เท่ากับ 5.90 และ *Capsicum annuum* มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 66.45 กิโลดาลดัน และ pI เท่ากับ 5.30 แสดงว่าเป็น Acidic Protein

เมื่อเปรียบเทียบ ลำดับกรดอะมิโนของ HbKR1 กับ KR1 ของพืชอื่นๆ พบว่า HbKR1 ของยางพาราประกอบด้วยบริเวณ Conserved Sequences ของ ANK และ ZFP เช่นเดียวกับ KR1 ของ *Ricinus*, *Arabidopsis*, *Capsicum*, *Oryza* และ *Medicago* โปรตีน KR1 ประกอบด้วยกรดอะมิโนของ ANK จำนวน 72 Residues และกรดอะมิโนของ ZFP จำนวน 26 Residues (Seong, et al. 2007 : 953) โดย ANK มีบริเวณ High Conserved Sequences อยู่ด้าน N-Terminal ได้แก่ TPLM (Threonine, Proline, Leusine และ Methionine) กับ TALH (Threonine, Alanine, Leusine และ Histidine) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ โวโรนินและคิเซิลวา (Voronin and Kiseleva. 2007 : 2) ที่พบว่าโปรตีน ANK มีบริเวณสำคัญที่ทำให้เกิดโครงสร้างแบบ L-Form ประกอบด้วยกรดอะมิโน 4 ชนิดคือ Threonine, Proline, Leusine, Histidine เรียกบริเวณนี้ว่า TPLH motif และจากการศึกษาของ แพทริค , วิลเลียม , อัลฟองโซ , ซามูเอลและเบอร์นาร์ด (Patrick, William, Alphonse, Samuel and Bernard. 1997 : 19225) พบว่า TPLH-AA--G เป็น Highly Conserved ของ ANK ซึ่งกรดอะมิโนดังกล่าวทำให้เกิดเกลียว แรกของ α-Helix โดย T เป็นกรดอะมิโนตัวแรกของการเกิด α-Helix (Initiating α-Helices) G เป็นกรดอะมิโนสิ้นสุดการเกิด α-Helix (Terminating α-Helices) และ H เป็นกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับ Supporting Inter-Repeat Stabilizing ส่วนโปรตีน ZFP เป็นชนิดที่มีกรดอะมิโน Cysteine จำนวน 3 Residues และ Histidine จำนวน 1 Residues (C3H-Type Zinc Finger Motif) ซึ่งตำแหน่ง Conserved Sequence นี้อยู่บริเวณตรงกลางของโปรตีน (Central Part of Protein) มีลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโน CCCH คือ $C\text{-}X_8\text{-}\ C\text{-}X_5\text{-}\ C\text{-}X_3\text{-}H$ ซึ่งเหมือนกลุ่ม C3H-Type Zinc Finger Motif ที่พบใน *Arabidopsis* และ *Oryza* มีหลาย Families และ

มีการเรียงลำดับของกรดอะมิโนตั้งแต่ $C\text{-}X_{6\text{-}14}\text{-}\ C\text{-}X_{4\text{-}5}\text{-}\ C\text{-}X_3\text{-}H$ (Wang, Guo, Wu, Yang, Li and Zheng. 2008 : 2)

5.1.4 การแสดงออกของ ยีน *HbKR1* ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของต้นกล้ายางพารา สายพันธุ์ RRIM600

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของ ยีน *HbKR1* ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของต้นกล้ายางพาราสายพันธุ์ RRIM600 ได้แก่ ใบอ่อน ใบเจริญเต็มที่ ใบชราภาพ ก้านใบ รากและน้ำยาง พบว่า ยีน *HbKR1* มีการแสดงออกในทุกเนื้อเยื่อแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยมีการแสดงออกสูงสุดในเนื้อเยื่อใบเจริญเต็มที่ และน้อยที่สุดในเนื้อเยื่อราก จากรายงานการวิจัยเกี่ยวกับบทบาทหน้าที่ของยีน *CaKR1* ในพริก (Seong, et.al. 2007a : 955) และมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *CaKR1* (Seong, et.al. 2007b : 985) พบว่า *CaKR1* มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียดจากความเค็มสูงและ การขาดน้ำ ผลของความเครียดนี้ทำให้มีการสร้างฮอร์โมน ABA เพิ่มขึ้น ซึ่งฮอร์โมน ABA จะทำหน้าที่กระตุ้นการปิดปากใบเพื่อลดการคายน้ำ ซึ่งกลไกเหล่านี้จะเกิดขึ้นที่ใบ แสดงว่า การแสดงออกของยีน *HbKR1* ของยางพาราอาจเกี่ยวข้องกับการปิดปากใบเช่นกัน จึงทำให้ยีน *HbKR1* แสดงออกสูงสุดในใบที่เจริญเต็มที่

5.1.6. ผลของการขาดน้ำและความเค็มต่อการแสดงออกของ ยีน *HbKR1* ในเนื้อเยื่อ ต่างๆ ของกล้ายางพาราติดตาสายพันธุ์ RRIM600

5.1.6.1. ผลของการขาดน้ำต่อการแสดงออกของ ยีน *HbKR1* ในเนื้อเยื่อใบและเนื้อเยื่อลำต้น

เนื่องจากน้ำเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของเซลล์พืช และเป็นสารตัวกลางที่สำคัญในการเกิดปฏิกิริยาชีวเคมี ต่างๆ ดังนั้นในสภาวะที่พืชขาดน้ำทำให้พืชเกิดความเครียดเนื่องมาจากแรงดันเต่งภายในเซลล์ลดลงทำให้เกิด Plasmolysis และพืชจะแสดงอาการเหี่ยว มีผลกระทบต่อกลไกการสังเคราะห์แสง ทำให้การเจริญเติบโตลดลง เป็นต้น ด้วยเหตุนี้ พืชจึงมีกลไกการตอบสนองต่อความเครียดจากการขาดน้ำ หลายวิธีการด้วยกัน เช่น มีการสร้างฮอร์โมน ABA เพิ่มมากขึ้น โดยการตอบสนองอันดับแรกที่เกิดขึ้นคือ ฮอร์โมน ABA จะกระตุ้นให้ปิดปากใบเพื่อลดการคายน้ำ นอกจากนี้ฮอร์โมน ABA ยังทำหน้าที่เป็นสัญญาณทางเคมี (Chemical Signal) ที่ทำให้พืชรับรู้ว่าเกิดภาวะขาดน้ำ และกระตุ้นทำให้เกิดการตอบสนองต่อภาวะดังกล่าวผ่านการทำงานของยีน 2 กลุ่ม คือ กลุ่มยีนที่ตอบสนองทันทีหลังจากที่ได้รับสัญญาณความเครียด เรียกว่า Early Gene และกลุ่มยีนที่ตอบสนองภาย หลังที่ได้รับการกระตุ้นจาก Early Gene เรียกว่า Delayed Gene (Mahajan and Tuteja. 2005 : 140) โดย ABA จะส่งสัญญาณไปกระตุ้นกลุ่ม Early Gene หลายๆ ยีน ให้มีการแสดงออก เช่น TFs (Transcription Factors) ซึ่งมีหลายชนิด ได้แก่ DRE (Dehydration

Responsive Elements), bZip (Basic Leucine Zipper), MYC/MYB (Myelocytomatosis Oncogene/Myeloblastosis Oncogene) และ ZFP (Zinc Finger Protein) เป็นต้น หลังจากนั้น TFs เหล่านี้จะไปกระตุ้นกระบวนการเริ่มต้นการถอดรหัส (Transcription Initiation) ของกลุ่ม Delayed Gene โดยจะเข้าไปจับตรงตำแหน่ง ต่างๆ เช่น C-Repeats/Dehydration Responsive Elements (CRT/DRE), ABA-Responsive Element (ABRE), MYC Recognition Sequence (MYCRS) และ MYB Recognition Sequence (MYBRS) บน Promoter ของ Stress Responsive Gene ให้มีการแสดงออกและสังเคราะห์โปรตีน ต่างๆ เพื่อตอบสนองต่อภาวะดังกล่าว ทำให้พืชมีความต้านทานและสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ เช่น สร้างเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ กลุ่ม Osmolytes ต่างๆ ทำหน้าที่ในรักษาสภาพหรือป้องกันไม่ให้องค์ประกอบต่างๆ ในเซลล์เสียสภาพไป มีการสร้างเนื้อเยื่อลำเลียง น้ำเพิ่มมากขึ้น (Transporters) เพื่อ เพิ่มประสิทธิภาพในการลำเลียงน้ำ สังเคราะห์ Detoxification Enzyme เพื่อลดความเป็นพิษในเซลล์ เป็นต้น (Shinozaki and Yamakuchi. 2007 : 222)

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *HbKR1* เนื่องจากการขาดน้ำในเนื้อเยื่อใบและเนื้อเยื่อลำต้น ของยางพารา พบว่ายีน *HbKR1* มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยเนื้อเยื่อใบมีระดับการแสดงออกของยีนสูงขึ้นทันทีหลังจากที่งดให้น้ำ เป็นเวลา 1 วัน และอยู่ระดับใกล้เคียงหลังจากงดให้น้ำ 6 วัน กระทั่ง มีระดับการแสดงออกสูงที่สุด หลังงดให้น้ำ 8 และ 10 วัน ตามลำดับ ส่วนเนื้อเยื่อลำต้นระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นหลังจากที่งดให้น้ำเป็นเวลา 4 วันและมีระดับการแสดงออกสูงขึ้นอีกหลังงดให้น้ำ 6 วัน 8 วันและ 10 วัน ตามลำดับ แสดงว่า การขาดน้ำส่งผลให้ยีน *HbKR1* มีการแสดงออกมากขึ้น ทั้งในเนื้อเยื่อใบและลำต้น เนื่องจาก ภาวะขาดน้ำทำให้ต้นยางเกิดความเครียด และส่งเสริมให้มีการแสดงออกของยีน *KR1* เพิ่มขึ้น โดยยีน *HbKR1* อาจจะเป็น TF ตัวชนิด Early Gene ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการขาดน้ำ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในพริก ที่พบว่าผลของการขาดน้ำส่งผลให้ ใบพริกมีการสร้างฮอร์โมน ABA มากขึ้นและชักนำให้ยีน *CaKR1* มีการแสดงออกมากขึ้น (Seong, et al. 2007a : 955) นอกจากนี้การศึกษาใน *Artemisia desertorum* Spreng. พบว่าภายใต้สภาวะที่แห้งแล้งและการชักนำโดยฮอร์โมน ABA มีผลทำให้ยีน *AdZFP1* (RING Zinc Finger Ankyrin Protein) มีการแสดงออกมาก เมื่อมีการถ่ายโอนยีน *AdZFP1* ในยาสูบ (Tobacco) พบว่า ต้นยาสูบที่รับการถ่ายโอนยีนสามารถทนทานต่อความแห้งแล้งได้ดีกว่าต้นปกติ (Yang, et al. 2008 : 106)

5.1.6.2. ผลของความเค็มต่อการแสดงออกของยีน *HbKR1* ในเนื้อเยื่อใบและลำต้น

ความเค็ม เป็นสาเหตุอย่างหนึ่งที่ทำให้การเจริญ เติบโต และการให้ผลผลิตของพืชลดลง เนื่องจากความเค็มส่งให้พืชเกิด Osmotic Stress หากในดินมีความเข้มข้นของเกลือสูง ส่งผลให้น้ำในดินมีแรงดันออสโมติก (Osmotic Pressure) เพิ่มขึ้น จึงทำให้ Water Potential ของน้ำในดินต่ำกว่าในเซลล์ของพืช ทำให้ น้ำภายในเซลล์พืช แพร่ ออกมาใ นดิน ส่งผลให้พืช ขาดน้ำ นอกจากนี้ความเค็มทำให้เกิ ดความเป็นพิษจากการที่พืชดูด สะสม สาร โซเดียมและคลอไรด์ มากเกินไป แต่พืชมีกลไกการตอบสนองต่อความเค็มได้ โดยมีกลไกคล้ายกับการที่พืชขาดน้ำคือ เมื่อพืชถูกกระทบจากความเค็มสูง พืชจะมีการตอบสนองโดยการสร้างฮอร์โมน ABA มากขึ้น เพื่อปิดปากใบลดการคายน้ำและส่งสัญญาณเข้าไปในเซลล์ กระตุ้นให้มีการสังเคราะห์กลุ่ม TFs ต่างๆ จากนั้นโปรตีนเหล่านี้จะไปกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์ กลุ่มโปรตีน เฉพาะที่ตอบสนองต่อความเค็ม ทำให้พืชสามารถทนเค็มและเจริญเติบโตได้ เช่น ลดการสะสมของเกลือในไซโทพลาสซึ มโดยนำไปเก็บไว้ที่แวคิวโอล เพื่อลดความเป็นพิษของโซเดียม มีการสร้างเอนไซม์ต่างๆ เพื่อให้มีความสามารถทนต่อความเข้มข้นของเกลือสูง สังเคราะห์กลุ่ม Osmolytes ต่างๆ ได้แก่ Proline, Glycine-Betaine หรือ Glutamate เพื่อปรับแรงดันออสโมติกใน ไซโตพลาสซึม และรักษาความเ ต่งของเซลล์ให้มี Water Potential ในพืชต่ำกว่าในดิน นอกจากนี้อาจมีการสร้างสารเคลือบใบหรือสร้างใบให้หนาขึ้น เพื่อเก็บน้ำไว้ เป็นต้น (Mahajan and Tuteja. 2005 : 146 ; Shinozaki and Yamakuchi. 2007 : 222)

จากการวิเคราะห์ผลของความเค็มต่อการแสดงออกของ ยีน *HbKR1* ทั้งในเนื้อเยื่อใบและลำต้นของยางพารา พบว่า ยีน *HbKR1* มีการแสดงออกสูงขึ้นหลังจากได้รับโซเดียม-คลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 0.5 ชั่วโมง แสดงว่าความเค็มมีผลต่อการแสดงออกของยีน *HbKR1* ในยางพาราและน่าจะเป็น TF ที่มีการตอบสนองทันทีหลังจากได้รับความเค็ม เนื่องจากความเค็มของเกลืออาจส่งเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์และต้นยางแสดงอาการขาดน้ำ สอดคล้องกับการวิจัยของ ซียอนและคณะ (Seong, et al. 2007a : 955) ในพริก พบว่า ความเค็ม ส่งผลให้มีการสร้างฮอร์โมน ABA มากขึ้น และส่งผลให้ ยีน *CaKR1* มีการแสดงออกมาก เมื่อ มีการ ถ่ายโอนยีน *CaKR1* ในมะเขือเทศ ปรากฏ ว่า ต้นมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *CaKR1* มีความทนทานต่อความเค็มได้ดีกว่าต้นปกติ (Seong, et al. 2007b : 985)

5.1.7 ผลของการกรีดต่อการแสดงออกของ ยีน *HbKR1* ในน้ำยางพารา สายพันธุ์ RRIC110

เมื่อวิเคราะห์ผลของการกรีดถี่ (กรีดทุก วัน) และกรีดปกติ (กรีดวันเว้น 2 วัน) ต่อการแสดงออกของยีน *HbKR1* ในยางพาราสายพันธุ์ RRIC110 จากการกรีดทั้งหมดเป็นเวลา 10 วัน พบว่ายีน *HbKR1* มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยการกรีดครั้งแรกจะมีการแสดงออกของยีนต่ำที่สุด และในกลุ่มที่กรีดถี่จะมีการแสดงออก ยีน *HbKR1* สูงกว่าในกลุ่มที่กรีดปกติ แสดงว่าการกรีดถี่ทำให้ต้นยางเกิดความเครียดสูงกว่าการกรีดปกติ เนื่องจากการกรีดแต่ละครั้งมีผลทำให้เกิดการสูญเสียน้ำและธาตุอาหารต่างๆ ที่ไหลออกมาพร้อมกับน้ำยาง นอกจากนี้การกรีดก่อให้เกิดบาดแผลที่ลำต้นของยางพารา การคุกคามของแบคทีเรียและเชื้อราเกิดขึ้นได้ง่าย การแพร่ของออกซิเจนจากอากาศภายนอกผ่านเข้าสู่เซลล์มีมากขึ้น นำไปสู่การสะสมของ ROS (Oxygen Free Radicals) ในเซลล์ ทำให้เกิดภาวะ Oxidative Stress จึงเป็นไปได้ว่าความเครียดเหล่านี้ส่งผลให้ยีน *HbKR1* แสดงออกมาก ซึ่งอาจทำหน้าที่ในการกระตุ้นการสร้างฮอร์โมนต่างๆ ที่เกี่ยวกับการตอบสนองต่อ Biotic Stress ในยางพารา เช่น ฮอร์โมนซาลิไซลิค (Salicylic), เอธิลีน (Ethylene) เป็นต้น สอดคล้องกับ การศึกษาในต้นมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *CaKR1* (Transgenic Tomato Plant Expressing *CaKR1*) พบว่าต้นมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *CaKR1* สามารถต้านทานต่อการคุกคามจากเชื้อรา *Phytophthora infestans* และลดการเกิด Oxidative Stress เนื่องจากการแสดงออกของยีน *CaKR1* มีผลทำให้ระดับ ROS เช่น Superoxide (O_2^-) และ Hydrogen Peroxide (H_2O_2) ในเซลล์ลดลง นอกจากนี้ ยังมีผลทำให้มีการสังเคราะห์กลุ่ม PR-protein (Pathogenesis-Related Protein) และโปรตีนที่ตอบสนองต่อ Oxidative Stress (Oxidative Stress Responsive Protein) เช่น Superoxide Dismutase, Ascorbate Peroxidase เพิ่มมากขึ้น (Seong, et al. 2007b : 982)

5.2 สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาการโคลนและวิเคราะห์คุณลักษณะของยีน *HbKR1* ในยางพารา สามารถสรุปได้ดังนี้

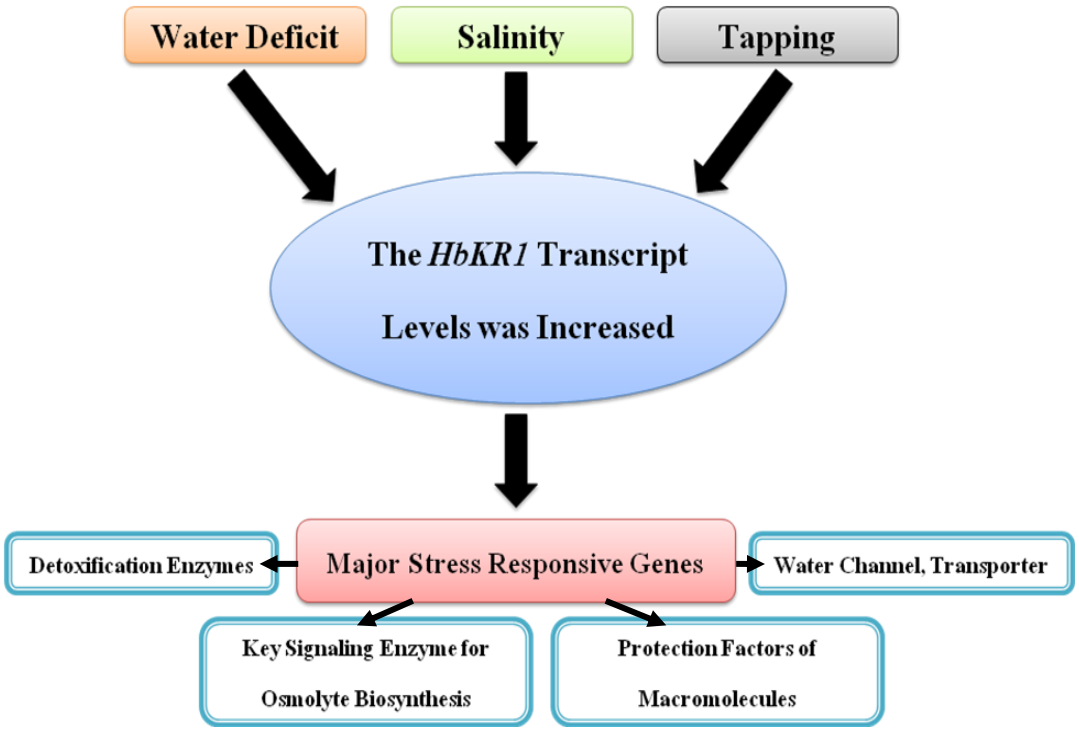
5.2.1 ยีน *HbKR1* ในยางพาราประกอบด้วย นิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 2,596 คู่เบส ประกอบด้วยส่วนที่แปลรหัส จำนวน 2,106 คู่เบส เป็นรหัสกรดอะมิโน 701 Residues มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 72.52 กิโลดาลตัน มีค่า pI เท่ากับ 5.60 และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เป็นรหัสกรดอะมิโนด้านปลาย 5′ จำนวน 204 คู่เบส และด้านปลาย 3′ จำนวน 286 คู่เบส

5.2.2 ลำดับกรดอะมิโน HbKR1 ของยางพารามีบริเวณ Conserved Sequences ที่บ่งชี้ว่าเป็นโปรตีน Ankyrin Repeat Domain และ C_3H_1 Zinc Finger Protein เหมือนกับ KR1 ของพืชชนิดอื่นๆ โดยมีบริเวณ Conserved Sequences ของโปรตีน Ankyrin Repeat (ANK) จำนวน 72 Residues มีตำแหน่ง ระหว่าง ลำดับกรดอะมิโนที่ 73-133 และมีบริเวณ Conserved Sequences ของโปรตีน Zinc Finger อยู่บริเวณตรงกลางของโปรตีน โดยมีตำแหน่งอยู่ระหว่างลำดับกรดอะมิโนที่ 275-297 และมีลำดับกรดอะมิโน Homology กับลำดับกรด อะมิโน KR1 ของ *Ricinus communis*, *Capsicum annuum*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* และ *Medicago truncatula* เท่ากับ 81.2%, 56.6%, 54.5%, 43.3% และ 39.4% ตามลำดับ

5.2.3 ยีน *HbKR1* มีการแสดงออกใน ทุกเนื้อเยื่อของกล้ายางพาราสายพันธุ์ RRIM600 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยมีการแสดงออกมากที่สุดในใบ ที่เจริญเต็มที่ และแสดงออกน้อยที่สุดในราก

5.2.4 การขาดน้ำและความเค็มมีผลให้การแสดงออกของยีน เพิ่มขึ้นทั้งในเนื้อเยื่อใบและลำต้น เมื่อระยะเวลาในการขาดน้ำและความเค็มเพิ่มขึ้นการแสดงออกของยีนก็เพิ่มขึ้นด้วย โดยการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อใบเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ตั้งแต่งดให้น้ำเป็นเวลา 1 วัน ส่วนในเนื้อเยื่อลำต้นการแสดงออกของยีน เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ตั้งแต่งดให้น้ำเป็นเวลา 4 วัน สำหรับต้นยางพาราที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ทั้งในเนื้อเยื่อใบและลำต้นมีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ตั้งแต่ได้รับโซเดียมคลอไรด์เป็นเวลา 0.5 ชั่วโมง

5.2.5 การกรีดยางมีผลให้การแสดงออกของยีน *HbKR1* ในน้ำยางพาราเพิ่มขึ้นทั้งระบบการกรีดวันเว้นวัน และการ กรีดทุกวัน โดยยางพาราที่ถูก กรีดทุกวันจะ มีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นมากกว่าต้นยางที่กรีดวันเว้น 2 วันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพที่ 28 สรุปกลไกการตอบสนองของยีน *HbKR1* ต่อการขาดน้ำ ความเค็มและการกรีด

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. ผลการวิจัย เกี่ยวกับ ยีน *KR1* ในยางพารา สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษายีน *KR1* ในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ได้

2. ควรนำผลการวิจัยที่ได้ไป ศึกษาต่อในระดับโปรตีน เพื่อ นำไปใช้ประโยชน์เป็นเครื่องหมายคัดเลือกพันธุ์ยางพาราที่ทนแล้ง และทนความเค็ม หรือพัฒนาไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาสายพันธุ์ยางทนแล้งและทนเค็มต่อไป