

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลของโพแทสเซียมคลอไรด์และอุณหภูมิต่อการออกดอกของลำไยพันธุ์ดอ

เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าการชักนำการออกดอกของลำไยสามารถทำได้โดยอาศัยอุณหภูมิต่ำ และการใช้ $KClO_3$ โดยจากการศึกษาพบว่า การราด $KClO_3$ ทางดินอัตรา 400 ppm สามารถชักนำการออกดอกของลำไยได้ โดยมีผลทำให้ดอกออกได้เร็วกว่าการชักนำด้วยอุณหภูมิต่ำ ($17/12^\circ C$) ถึง 22 วัน (นับจากวันที่เริ่มทดลอง) และมีเปอร์เซ็นต์การออกดอกสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 94.81 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การชักนำด้วยอุณหภูมิ ($17/12^\circ C$) สามารถกระตุ้นการออกดอกได้เช่นเดียวกัน แต่มีเปอร์เซ็นต์การออกดอกที่น้อยกว่าเพียง 25.14 เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตามการออกดอกตามธรรมชาติ (ชุดควบคุม) พบว่าไม่ออกดอก (ตารางที่ 9 และภาพที่ 14)

ดังนั้นชี้ให้เห็นว่า $KClO_3$ สามารถชักนำการออกดอกของลำไยได้เช่นเดียวกับการชักนำด้วยอุณหภูมิต่ำ แต่มีระยะเวลาการพัฒนาดอกที่สั้นกว่า (22วัน) และมีเปอร์เซ็นต์การออกดอกมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 9 ผลของโพแทสเซียมคลอไรด์ และอุณหภูมิต่อการออกดอกของลำไยพันธุ์ดอ

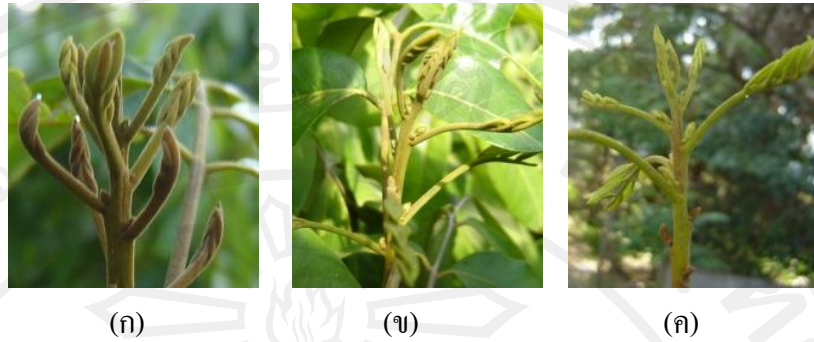
กรรมวิธี	ระยะเวลาออกดอก (จำนวนวันหลังจากเริ่มทำการทดลอง)	การออกดอก (เปอร์เซ็นต์)
ชุดควบคุม	ไม่ออกดอก	0.00c
ราด $KClO_3$ อัตรา 400 ppm	22a ^{1/}	94.81a
ปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ (day 17/night 12°C)	44b	25.14b

LSD_{0.05}

*

*

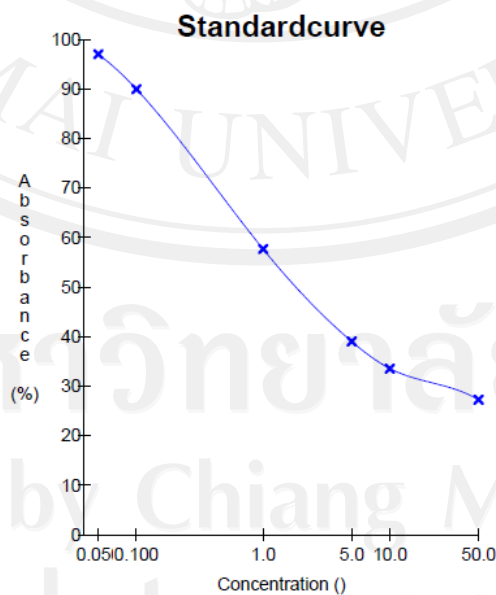
^{1/} ตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD)



ภาพที่ 15 การเปลี่ยนแปลงตายอดลำไยในวันที่ 22 หลังจากเริ่มทำการทดลองของชุดควบคุมที่ไม่การออกดอก (ก) การชักนำการออกดอกโดยธาตุ $KClO_3$ ทางดิน (ข) การชักนำการออกดอกโดยการปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ ($17/12^{\circ}C$) ที่ออกดอกในวันที่ 44 หลังจากเริ่มทำการทดลอง (ค)

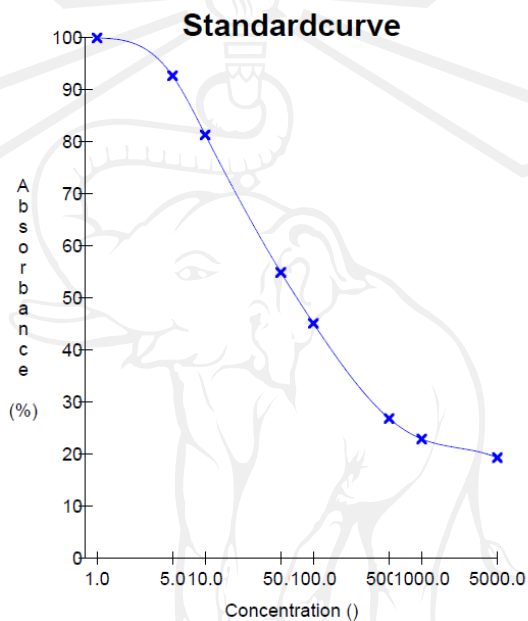
4.2 ผลของโพแทสเซียมคลอเรต และอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณไซโตไคนินในส่วนของยอด ใบ และรากลำไยพันธุ์ต่อ

จากไมโครเพลทชนิด 96 หลุม เคลือบเพลทด้วย pAB-iP/iPA อัตราเจือจาง 1:200 เท่า และใช้ฮอร์โมน iP/iPA ความเข้มข้น 10 5 1 0.5 0.1 0.05 0.01 และ 0 นาโนกรัม/50 ไมโครลิตร เอนไซม์ iP/iPA -AP อัตราเจือจาง 1:200 เท่า นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 ด้วยเครื่อง Microplate reader พบว่า เส้นกราฟมาตรฐานของฮอร์โมน iP/iPA (ภาพที่ 16) พบความไวของการทำปฏิกิริยาที่ 50% binding ได้ 1.8 ng/50ul



ภาพที่ 16 เส้นกราฟมาตรฐานของฮอร์โมน iP/iPA

ส่วนฮอร์โมน *tZ/ZR* เคลือบเพลทด้วย pAB-*tZ/ZR* อัตราเจือจาง 1:200 เท่า และใช้ฮอร์โมน *tZ/ZR* ความเข้มข้น 10 5 1 0.5 0.1 0.05 0.01 และ 0 นาโนกรัม/50 ไมโครลิตร เอนไซม์ ZR-HRP อัตราเจือจาง 1:1000 เท่า นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 ด้วยเครื่อง Microplate reader พบว่า เส้นกราฟมาตรฐานของฮอร์โมน *tZ/ZR* (ภาพที่ 17) พบความไวของการทำปฏิกิริยาที่ 50% binding ได้ 70.3 ng/50ul



ภาพที่ 17 เส้นกราฟมาตรฐานของฮอร์โมน *tZ/ZR*

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในตารางที่ 9 ว่ากรรมวิธีราด $KClO_3$ ทางดิน เริ่มแทงช่อดอกเมื่อวันที่ 22 หลังเริ่มทำการทดลองเมื่อเทียบกับกรรมวิธีปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ ($17/12^\circ C$) ที่แทงช่อดอกเมื่อ 44 วันหลังเริ่มทำการทดลอง และชุดควบคุมที่ไม่ออกดอก ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณไซโตไคนินชนิด iP/iPA และ *tZ/ZR* ในเนื้อเยื่อส่วนของยอด ใบ และปลายรากของต้นลำไยที่มีผลอันเนื่องมาจากกรรมวิธีราด $KClO_3$ อัตรา 400 ppm กรรมวิธีปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ ($17/12^\circ C$) และชุดควบคุม ดังต่อไปนี้

การเปลี่ยนแปลงปริมาณไซโตไคนินชนิด iP/iPA

ตายอด

จากภาพที่ 18 (ก; ภาพบน) แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงปริมาณไซโตไคนินชนิด iP/iPA ในส่วนของตายอดในช่วงวันที่ 15-30 หลังเริ่มทำการทดลอง พบว่า ปริมาณ iP/iPA ในยอดของกรรมวิธีควบคุมเริ่มลดลงเมื่อวันที่ 15 หลังเริ่มทำการทดลองเมื่อเทียบกับกรรมวิธี $KClO_3$ ทางดิน

และกรรมวิธีปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ ($17/12^{\circ}\text{C}$) ที่มีปริมาณ iP/iPA เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากนั้นในวันที่ 20 ปริมาณ iP/iPA ในส่วนของตายอดในกรรมวิธีควบคุมจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีธาตุ KClO_3 ทางดิน ในขณะที่กรรมวิธีปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ ($17/12^{\circ}\text{C}$) มีปริมาณ iP/iPA ลดลงมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากนั้นในวันที่ 20 หลังเริ่มทำการทดลองปริมาณ iP/iPA ในทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกัน แต่มีแนวโน้มว่าปริมาณ iP/iPA ในกรรมวิธีธาตุ KClO_3 ทางดิน เพิ่มสูงขึ้นกว่ากรรมวิธีอื่นซึ่งเป็นช่วงที่พบการแทงช่อดอกของต้นลำไยในกรรมวิธีดังกล่าว และมีปริมาณ iP/iPA เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในวันที่ 30 หลังเริ่มทำการทดลอง

ใบ

ในส่วนของใบลำไยในวันที่ 15 หลังจากเริ่มทำการทดลอง ปริมาณ iP/iPA ในกรรมวิธีธาตุ KClO_3 อัตรา 400 มิลลิกรัมต่อลิตร เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ กรรมวิธีควบคุม และกรรมวิธีธาตุ KClO_3 ทางดินที่มีปริมาณ iP/iPA ในใบต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากนั้นปริมาณ iP/iPA ของทุกกรรมวิธีในส่วนของใบไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในวันที่ 20 หลังเริ่มทำการทดลอง และปริมาณ iP/iPA ในกรรมวิธีธาตุ KClO_3 ทางดินจะลดลงต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อวันที่ 25 หลังเริ่มแทงช่อดอก จากนั้นในวันที่ 30 ปริมาณ iP/iPA ของทุกกรรมวิธีจะมีปริมาณที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ปลายราก

ในส่วนของปลายรากในวันที่ 15 หลังจากเริ่มทำการทดลอง ปริมาณ iP/iPA ในกรรมวิธีธาตุ KClO_3 มีปริมาณสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกรรมวิธีปลูกเลี้ยงภายใต้ อุณหภูมิต่ำและกรรมวิธีควบคุม จากนั้นปริมาณ iP/iPA ในกรรมวิธีธาตุ KClO_3 จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในช่วงวันที่ 20 หลังก่อนการแทงช่อดอก ซึ่งเมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ไม่ออกดอก) ที่มีปริมาณ iP/iPA ในส่วนของปลายรากมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อวันที่ 25 หรือวันที่กรรมวิธีธาตุ KClO_3 ทางดิน เริ่มแทงช่อดอก ปริมาณ iP/iPA เพิ่มสูงขึ้นกว่ากรรมวิธีควบคุม แต่น้อยกว่ากรรมวิธีปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ ($17/12^{\circ}\text{C}$) ที่มีปริมาณ iP/iPA เพิ่มมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในวันที่ 30 หลังเริ่มทำการทดลอง

จากการเปลี่ยนแปลงปริมาณ iP/iPA ในส่วนของตายอด ใบ และปลายราก ที่มีผลต่อการออกดอก พบว่าปริมาณ iP/iPA ในส่วนของตายอดของกรรมวิธีราด $KClO_3$ มีแนวโน้มลดลงก่อนการออกดอก และจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วงแทงช่อดอก ซึ่งตรงกันข้ามกับปริมาณ iP/iPA ในส่วนของใบและปลายรากที่มีปริมาณลดลงในช่วงแทงช่อดอก

การเปลี่ยนแปลงปริมาณไซโตไคนินชนิด *z/zr*

ตายอด

ภาพที่ 18 (ข; ภาพบน) แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงปริมาณ ไซโตไคนินชนิด *z/zr* ในส่วนของตายอดในช่วงวันที่ 15-30 หลังเริ่มทำการทดลอง พบว่าในวันที่ 15 ปริมาณ *z/zr* ในทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกัน แต่จากนั้นในวันที่ 20 หลังเริ่มทำการทดลอง ปริมาณ *z/zr* ของกรรมวิธีราด $KClO_3$ ทางดินเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแล้วจะเพิ่มสูงอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งแทงช่อดอก

ใบ

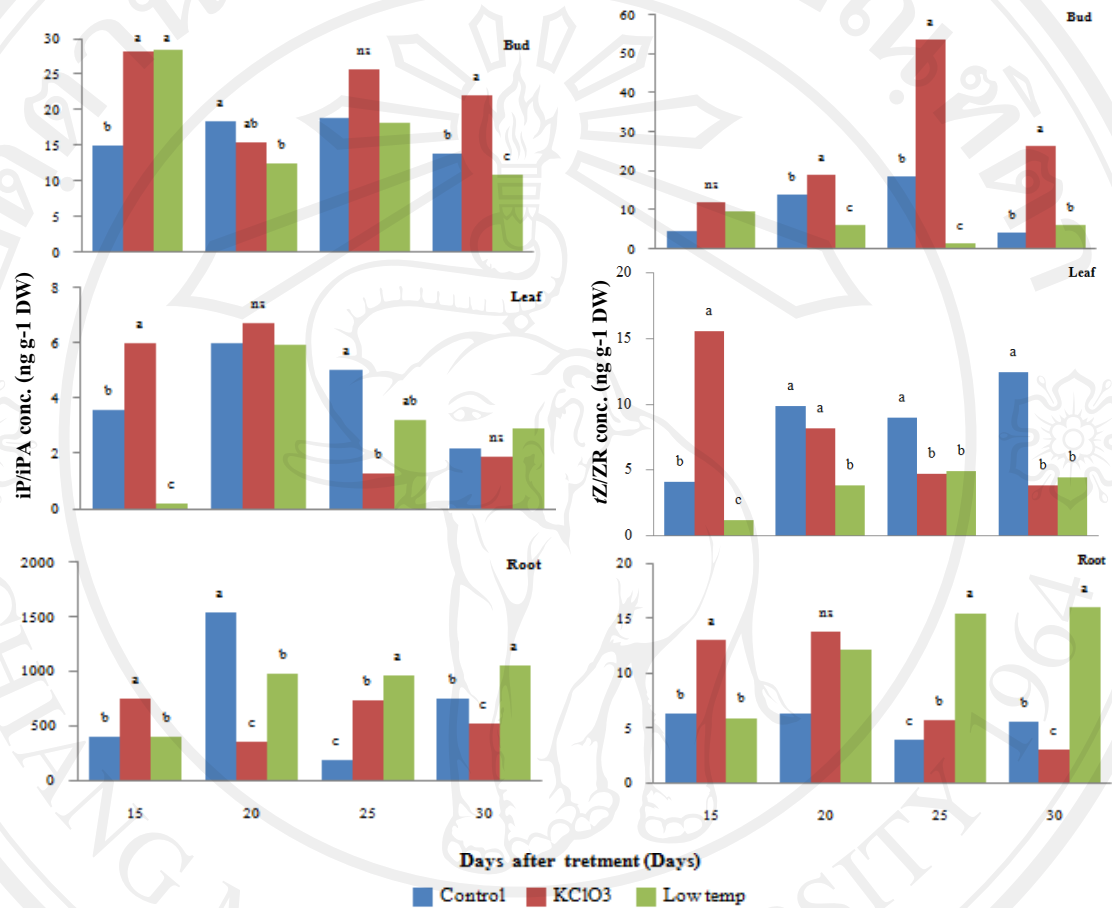
ในทางตรงกันข้ามกับตายอดปริมาณ *z/zr* ในส่วนของใบของกรรมวิธีราด $KClO_3$ ทางดินเริ่มลดลงตั้งแต่วันที่ 15-20 หลังเริ่มทำการทดลองและจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 25 หลังเริ่มทำการทดลอง ซึ่งเป็นช่วงแทงช่อดอก อย่างไรก็ตามตั้งแต่วันที่ 20-30 วันหลังเริ่มทำการทดลอง ปริมาณ *z/zr* ในกรรมวิธีควบคุมซึ่งไม่ออกดอกจะมีปริมาณ *z/zr* ในช่วงเวลาดังกล่าวสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับปริมาณ *z/zr* ในกรรมวิธีปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ ($17/12^{\circ}C$) ที่มีแนวโน้มใกล้เคียงกับปริมาณ *z/zr* ของกรรมวิธีราด $KClO_3$ ทางดิน

ปลายราก

ในส่วนของปลายรากพบว่าปริมาณ *z/zr* ของกรรมวิธีราด $KClO_3$ อัตรา 400 มิลลิกรัมต่อลิตร มีแนวโน้มปริมาณ *z/zr* ในกรรมวิธีปลูกเลี้ยงใต้อุณหภูมิต่ำ ($17/12^{\circ}C$) และกรรมวิธีควบคุมแต่อย่างไรก็ตามในวันที่ 25 หรือวันที่กรรมวิธีราดทางดินด้วย $KClO_3$ แทงช่อดอก ปริมาณ *z/zr* ในปลายรากลดลง และลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลังแทงช่อดอก (วันที่ 30 หลังเริ่มทำการทดลอง) ในขณะที่ปริมาณ *z/zr* ในกรรมวิธีที่ปลูกเลี้ยงใต้อุณหภูมิต่ำ ($17/12^{\circ}C$) นั้น เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่วันที่ 25-30 หลังเริ่มทำการทดลอง

จากการเปลี่ยนแปลงปริมาณ *z/zr* ในส่วนของตายอด ใบ และปลายรากที่มีผลต่อการออกดอกพบว่า ปริมาณ *z/zr* ในส่วนของช่อดอกกรรมวิธีราดทางดินด้วย $KClO_3$ จะเพิ่มสูงขึ้นก่อนการ

ออกดอกจนกระทั่งแทงช่อดอก แต่ปริมาณ rZ/ZR ในส่วนของใบ และปลายรากจะมีแนวโน้มลดลง และลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่แทงช่อดอก



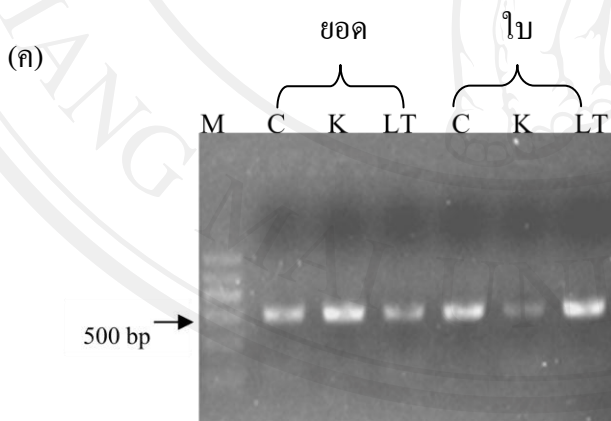
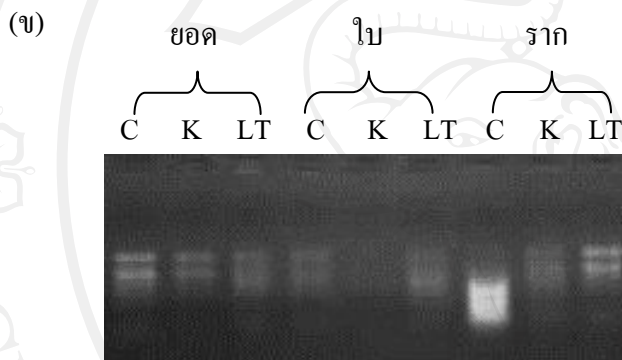
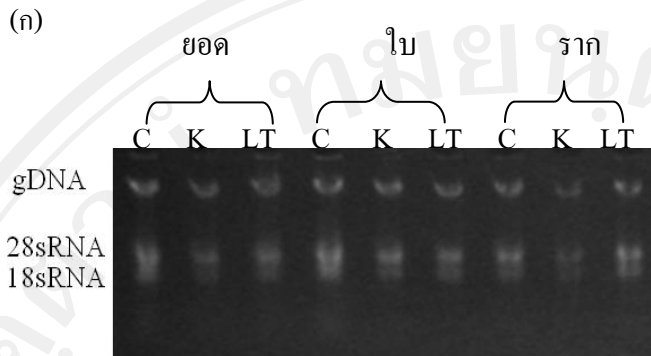
ภาพที่ 18 การเปลี่ยนแปลงปริมาณไซโตโคไนนชนิด ip/iPA (ก) และ rZ/ZR (ข) ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของลำไยในชุดควบคุม กรรมวิธีการโพแทสเซียมคลอเรต และกรรมวิธีปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ (17/12°C)

4.3 การจำแนกยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไซโตไคนินชนิด rZ ในลำไยภายหลังการชักนำให้ออกดอก

4.3.1 การสกัด RNA การกำจัดจีโนมิก DNA ที่ปนเปื้อน และการศึกษาการแสดงออกของยีนโดยวิธี RT-PCR

การสกัด RNA ด้วยวิธีการของกฤษณา (2553) โดยนำปลายยอด ใบ และปลายรากของลำไยที่นำมาสกัด RNA ทุก 5 วัน RNA ที่สกัดได้มีลักษณะเป็นตะกอนสีขาวใส ละลายน้ำได้ง่าย เมื่อนำไปตรวจสอบคุณภาพ RNA ด้วย 1.2 เปอร์เซ็นต์ฟอร์มาลดีไฮด์อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต พบว่าลักษณะแถบของ RNA เกิดขึ้นมีความคมชัดทั้ง 2 แถบ ซึ่งเป็น rRNA ขนาด 28s และ 18s (ภาพที่ 19 (ก)) อย่างไรก็ตามแถบ RNA ที่ได้ในแต่ละตัวอย่างมีความสว่างไม่เท่ากันแสดงถึงความเข้มข้นที่ต่างกัน ในการสกัด RNA ใช้ตัวอย่างพืชประมาณ 0.1 กรัม ละลายตะกอน RNA ด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เมื่อตรวจสอบปริมาณด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร พบว่ามีความเข้มข้น 100-800 ng/ μ l ผลการสกัด RNA ในเบื้องต้นพบว่าการปนเปื้อนของ genomic DNA คือ พบแถบที่มีขนาดใหญ่ ปรากฏอยู่เหนือแถบของ RNA (ภาพที่ 19 (ก)) จึงต้องกำจัดการปนเปื้อนที่เกิดขึ้นเพื่อไม่ให้กระทบต่อการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยา PCR การกำจัด genomic DNA ทำได้โดยใช้เอนไซม์ DNaseI (Fermentas Life Science, Canada) เมื่อนำ RNA มาตรวจสอบคุณภาพอีกครั้งบน 1.2 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต พบว่า RNA ไม่มีการปนเปื้อน เนื่องจากไม่พบแถบของ genomic DNA ปรากฏบนอะกาโรสเจล (ภาพที่ 19 (ข))

เนื่องจาก RNA เป็นผลของการถอดรหัส (transcription) ยีนที่แสดงออกต่างกันในแต่ละระยะการเจริญเติบโต และแต่ละส่วนของพืช อย่างไรก็ตาม RNA มีข้อจำกัดด้านความเสถียร จึงเปลี่ยนให้เป็น DNA โดยกระบวนการ reverse transcription ใช้ชุดน้ำยา SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, USA) ในการตรวจสอบผล reverse transcription อาศัยการเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยการทำปฏิกิริยา PCR ไพรมเมอร์ที่ใช้คือ α -tubulin forward primer และ α -tubulin reverse primer จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ไปตรวจสอบผลด้วย 1.2 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่า แถบของ cDNA มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส (ภาพที่ 19 (ค)) เพียงแถบเดียวตรงตามขนาดที่คาดหวังชี้ให้เห็นถึงคุณภาพที่ดีของ RNA และการกำจัดการปนเปื้อนของ genomic DNA ที่มีประสิทธิภาพ



ภาพที่ 19 การสกัด RNA การกำจัดจีโนมิก DNA ที่ปนเปื้อน และการศึกษาการแสดงออกของยีน โดยวิธี RT-PCR ((ก) แถบ RNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อต่างๆ ของลำไยบน 1.2 เปอร์เซ็นต์ฟอสฟอรัสดีไฮด์อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (ข) การกำจัดการปนเปื้อนของ gDNA (ค) การตรวจสอบผล reverse transcription อาศัยการเพิ่มปริมาณ cDNA จากการทำปฏิกิริยา PCR กำหนดให้ M: DNA marker (1200 bp DNA ladder); C: ชุดควบคุม K: กรรมวิธี KClO_3 อัตรา 400 ppm LT: กรรมวิธีปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ ($17/12^\circ\text{C}$) ในวันที่ 0 หลังจากเริ่มทำการทดลอง)

4.3.2 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับยีน *CYP735A2* การทดสอบดีเจเนอเรทไพรเมอร์ การนำ DNA สายผสมที่ได้เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α และการตรวจสอบชิ้น DNA ที่โคลน

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CYP735A2* ในพืช 6 ชนิด ได้แก่ 1) *Arabidopsis thaliana* 2) *Populus trichocarpa* 3) *Oryza sativa* 4) *Triticum aestivum* 5) *Pisum sativum* และ 6) *Nicotiana tabacum* สามารถออกแบบดีเจเนอเรทไพรเมอร์ได้จำนวน 4 ไพรเมอร์ โดยมีตำแหน่ง และขนาดแตกต่างกัน ดังแสดงภาพที่ 20 (ก)

จากนั้นนำ cDNA ของยอด ใบ และรากลำไยทั้ง 3 กรรมวิธีมารวมกันเพื่อใช้เป็น DNA ต้นแบบในการทดสอบดีเจเนอเรทไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์คู่ CYPDEG F1/R1 สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้ในเนื้อเยื่อลำไยส่วนของยอดกรรมวิธีรด KClO₃ อัตรา 400 ppm ใบกรรมวิธีปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ (17/12°C) รากชุดควบคุม รากกรรมวิธีรด KClO₃ อัตรา 400 ppm และรากกรรมวิธีปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ (17/12°C) ตรวจสอบผลด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาดประมาณ 340 คู่เบส (ภาพที่ 20 (ข))

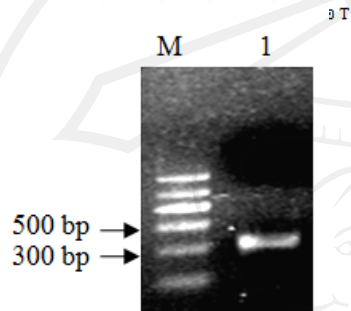
จากการนำ DNA สายผสมที่ได้เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α แล้วคัดเลือกโคโลนีที่มี pGEM[®]-T Easy Vector แทรกอยู่ที่เจริญบน LB agar plates (ampicillin/ IPTG / X-Gal) โดยสุ่มเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่ให้โคโลนีสีขาว (blue-white colony screening) จำนวน 20 โคโลนี ทำการตรวจหาขนาดโดยใช้ไพรเมอร์ M13 forward และ M13 reverse (ภาพที่ 20 (ค)) พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR มีความยาวทั้งสิ้น 588 คู่เบส (ภาพที่ 21) จากนั้นคัดเลือกโคลน DNA มา 5 โคลนเพื่อนำไปสกัดพลาสมิดโดยใช้ PureLink[™] Quick Plasmid Miniprep Kit (invitrogen, USA) จากนั้นนำโคลนที่มี DNA เป้าหมายแทรกอยู่ไปทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

(ก)

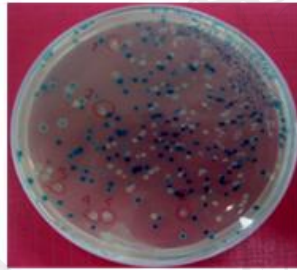
	ลำดับ CYPDEG (5'-3')	ตำแหน่ง	ขนาด (bp)
F1	GARTGYAARWBHTTYTWYTTYRCHGG	955-980	340
R1	GAAITYRTBBRCRTCCKBDCCCCA	1272-1295	
F2	TGGCARGWVMRKSYNMGNRMNGARGT	1029-1055	395
R2	GCRWRVKHYTGBCCDAYRCA	1405-1424	

หมายเหตุ N คือ A หรือ G หรือ C หรือ T, D คือ A หรือ G หรือ T, H คือ A หรือ C หรือ T, V คือ A หรือ C หรือ G,

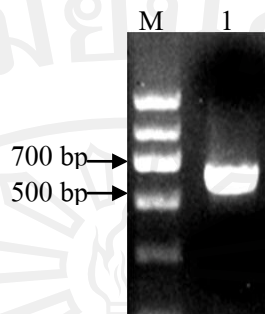
(ข)



(ค)



ภาพที่ 20 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับยีน *CYP735A2* การทดสอบดีเจเนอเรทไพรเมอร์ การนำ DNA สายผสมที่ได้เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α และการตรวจสอบชิ้น DNA ที่โคลน ((ก) ดีเจเนอเรทไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *CYP735A2* (ข) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้ดีเจเนอเรทไพรเมอร์ CYPDEG F1/R1 (1) ตรวจสอบด้วยตรวจสอบผลด้วย 1.2 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (M = DNA marker (1200 bp DNA ladder)) (ค) ลักษณะโคโลนีที่เจริญอยู่ LB agar plate)



ภาพที่ 21 ขนาดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ประมาณ 588 คู่เบส (1) ตรวจสอบผลด้วย 1.2 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (M = DNA marker 1200 bp DNA ladder)

4.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโดยเทคนิคชีวสารสนเทศศาสตร์

ยอด

จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลหลังวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งได้วิเคราะห์ทั้ง forward และ reverse โดยใช้โปรแกรม DNAMAN พบว่า กรรมวิธีควบคุมตายอดของกรรมวิธีรด $KClO_3$ อัตรา 400 ppm มีค่าความเหมือนของเส้น forward และ reverse เท่ากับ 96 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 22 (ก)) และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีขนาดประมาณ 287 คู่เบส (ภาพที่ 22 (ข)) แล้วแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนได้ 95 ตัว (ภาพที่ 22 (ค))

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยชุดโปรแกรม BLAST พบว่าการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม blastn นั้น ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีค่า identity กับ clone: LjB06P23, BM1998 จาก *Lotus japonicus* (AP009642.1) มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 79 ของ 287 คู่เบส เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน ด้วยโปรแกรม blastp รุ่น BLASTP 2.2.25 พบว่ามีค่า identity กับลำดับกรดอะมิโนของ hypothetical protein จาก *Vitis vinifera* (XP_002277056.1) มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 66 (ตารางที่

11)

1ST_BASE_394603_PGEM_11_8_M13F_PUC_40_:REVERSE_COMPLEMENT_1ST_BASE_394602_PGEM_11_7_M13R_20_identity= 96%

```

9  NNNNTGTATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCGACGTGCGCATGCTCCCGGCCGCC
|
637 AATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCGACGTGCGCATGCTCCCGGCCGCC
|
69  ATGGCGGCCGCGGAATTCGATTGAACTCGTCCACGTCCTCACCCCATGTTGTGCAGAGAG
|
697 ATGGCGGCCGCGGAATTCGATTGAACTCGTCCACATCCTCACCCCATGTTGTGCAGAGAG
|
129 TTTCAAGGACTCTGCATAGAAGTCAACGCATTGTCAAGCTGTGTGCTGTAAGCAATCTAA
|
757 TTTCAAGGACTCTGCATAGAAGTCAACGCATTGTCAAGCTGTGTGCTGTAAGCAATCTAA
|
189 TGGCGGAGTCAGGAGTGTAAACAACAGGAGGACAGGTTTTGGGTTCAAGAACTTGACTG
|
817 TGGCGGAGTCAGGAGTGTCAACAACAGGAGGACAGGTTTTGGGTTCAAGAACTTGACTG
|
249 GGACCTTCTGGGTTGATGTACAAAGAGCAGAAAGGAGGAGCACTCAATGTTGCTCTTAGTG
|
877 GGACCTTCTGGGTTGATGTACAAAGAGCAGAAAGGAGGAGCACTCAATGTTGCTCTTAGTG
|
309 AGCCATTGAGTGTGGACCAATAACAAGGCTTGAAAAGGTGGAGAATGTGGCAGTAAGAG
|
937 AGCCATTGAGTGTGGACCAATAACAAGGCTTGAAAAGGTGGAGAATGTGGCAGTAAGAG
|
369 TTGAGTTGAGAAATGGAATGTTGGTGGGGTGAAGATGCGGACGAGTTCAATCACTAGT
|
997 TTGAGTTGAGAAATGGAATGTTGGTGGGGGAGGACCGGACGAGTTCAATCACTAGT
|
429 GAATTCGCGGCCCTGACAGTGCACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATA
|
1057 GAATTCGCGGCCCTGACAGTGCACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATA
|
489 GCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGG
|
1117 GCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGNANNCANGN

```

ก

```

1  TCACCCCATG TGTGCAGAGA GTTTCAGGA CTCTGCATAG AAGTCAACGC ATTGTCAAGC
61  TGTGTGCTGT AAGCAATCTA ATGGCGGAGT CAGGAGTGTT AACAACTGAG AGGACAGGTT
121 TTGGGTTCAA GAACTTGACT GGGACCTTCT GGGTTGATGT ACAAAGAGCA GAAGGAGGAG
181 CACTCAATGT TGCTCTTAGT GAGCCATTGA GTGTTGGACC AATAACAAGG CTTGAAAAGG
241 TGGAGAATGT GGCAGTAAGA GTTGAGTTGA GAAATGGATG TGTGGG

```

ข

```

1  TPCVQRVSR LHRSQLRVKL CAVSNLMAES GVLTTERTGF GFKNLTGTFW VDVQRAEGGA
61  LNVALSEPLS VGPITRLEKV ENVAVRVELR NGCVG

```

ค

ภาพที่ 22 (ก) การ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยอดลำไยกรรมวิธีราด KClO_3 อัตรา 400 ppm ด้วยโปรแกรม DNAMAN (ข) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ได้จากยอดลำไยกรรมวิธีราด KClO_3 อัตรา 400 ppm และ (ค) ลำดับกรดอะมิโนของยีนที่ได้จากยอดลำไยกรรมวิธีราด KClO_3 อัตรา 400 ppm


```

1      TCGATTGAAC TCGTCCACGT CCTCACCCCA TGTGTGCAGA GAGTTTCAAG GACTCTGCAT
61     AGAAGTCAAC GCATTGTCAA GCTGTGTGCT GTAAGCAATC TAATGGCGGA GTCAGGAGTG
121    TCAACAAC TG AGAGGACAGG TTTTGGGTTC AAGAAGTGA CTGGGACCTT CTGGGTTGAT
181    GTACAAAGAG CAGAAGGAGG AGCACTCAAT GTCGCTCTTA GTGAGCCATT GAGTGTGGA
241    CCAATAACAA GGCTTGAAAA GGTGGAGAAT GTGGCAGTAA GAGTTGAGTT GAGAAATGGA
301    TGTGTTGGGT GGGGTG

```

ข

```

1      SIELVHVLTP CVQRVSR TLH RSQRIVKLCA VSNLMAESGV STTERTGFGF KNLTGTFWVD
61     VQRAEGGALN VALSEPLSVG PITRLEKVEN VAVRVELRNG CVGWG

```

ค

ภาพที่ 23 (ก) การ alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากใบลำไยกรรมวิธีปลูกเลี้ยงภายใต้ อุณหภูมิต่ำ (17/12°C) ด้วยโปรแกรม DNAMAN (ข) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ได้จาก ใบลำไยกรรมวิธีปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ (17/12°C) (ค) ลำดับกรดอะมิโนของยีนที่ได้ จากใบลำไยกรรมวิธีปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ (17/12°C)

รวม

ในชุดควบคุม เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการวิเคราะห์มาทำ alignment เพื่อยืนยัน ความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรม DNAMAN พบว่ามีความเหมือนกัน (identity) ของเส้น forward และ reverse เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 24 (ก)) และผลการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีขนาดประมาณ 334 คู่เบส (ภาพที่ 24 (ข)) แล้วแปลเป็นลำดับกรดอะมิโน ได้ 111 ตัว (ภาพที่ 24 (ค))

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยชุดโปรแกรม BLAST พบว่าการวิเคราะห์ด้วย โปรแกรม blastn นั้น ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีค่า identity กับ hypothetical protein จาก *Populus trichocarpa* (XM_002317866.1) มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 83 เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน ด้วยโปรแกรม blastp รุ่น BLASTP 2.2.25 พบว่ามีค่า identity กับลำดับกรดอะมิโนของ muconate cycloisomerase จาก *Ricinus communis* (XP_002528080.1) มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 73 (ตารางที่ 11)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยชุดโปรแกรม BLAST พบว่าการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม blastn นั้น ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีค่า identity กับ muconate cycloisomerase จาก *Ricinus communis* (XM_002528034.1) มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 77 เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม blastp รุ่น BLASTP 2.2.25 พบว่ามีค่า identity กับลำดับกรดอะมิโนของ muconate cycloisomerase จาก *Ricinus communis* (XP_002528080.1) มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 72 (ตารางที่ 11)

```

1ST_BASE_652694_DR_LT3_M13F_PUC__40 :REVERSE_COMPLEMENT_1ST_BASE_652699_DR_LT5_M13R
identity= 97%
6   GGCCAGTG.ATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCC
   |||||||
545 GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCC

65  CGGCCGCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTT.....GCGTCCTTCCCATGTTG
   |||||||
605 CGGCCGCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTTGAACTCATCCGCATCCTCACCCATGTTG

116 GCAGAGAGTTTCAAGGACTCTGCATTGAAGTCAACGCATTGTCAAGCTGTGTGCTGTAAG
   |||||||
665 GCAGAGAGTTTCAAGGACTCTTCATAGAAGTCAACGCATTGTCAAGCTGTGTGCTGTAAG

176 CAATCTAATGGCGGAGCCAGGAGTGTCAACAACCTGAGAGGACAGGTTTGGGTTCAAGAA
   |||||||
725 CAATCTAATGGCGGAGTCAAGGAGTGTCAACAACCTGAGAGGACAGGTTTGGGTTCAAGAA

236 CTTGACTGGGACCTTCTGGGTTGATGTACAAAGAGCAGAAGGAGGAGCACTCAATGTTGC
   |||||||
785 CTTGACTGGGACCTTCTGGGTTGATGTACAAAGAGCAGAAGGAGGAGCACTCAATGTTGC

296 TCTTAGTGAGCCATTGAGTGTGGACCAATAACAAGGCTTGAAAAGGTGGAGAATGTGGC
   |||||||
845 TCTTAGTGAGCCATTGAGTGTGGACCAATAACAAGGCTTGAAAAGGTGGAGAATGTGGC

356 AGTAAGAGTTGAGTTGAGAAATGGATGTGTTGGGTGGGTGGAAGATGGATGAGTTCAA
   |||||||
905 AGTAAGAGTTGAGTTGAGAAATGGATGTGTTGGGTGGGTGAGGATGTGGACGAGTTCAA

416 TCATTATTGAATTCGGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGATAGCTCCCAACGCGTTG
   |||
965 TCACTAGTGAATTCGGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTG

```

ก

```

1   GAAGTCAACG CATTGTCAAG CTGTGTGCTG TAAGCAATCT AATGGCGGAG CCAGGAGTGT
61  CAACAACCTGA GAGGACAGGT TTTGGGTTCA AGAAGTGGAC TGGGACCTTC TGGGTTGATG
121 TACAAAGAGC AGAAGGAGGA GCACTCAATG TTGCTCTTAG TGAGCCATTG AGTGTGGAC
181 CAATAACAAG GCTTGAAAAG GTGGAGAATG TGGCAGTAAG AGTTGAGTTG AGAAATGGAT
241 GTGTTGGGTG GGGTGA

```

ข

```

1   SQRIVKLCVAV SNLMAEPGVS TTERTGFGFK NLTGTFWVDV QRAEGGALNV ALSEPLSVGP
61  ITRLEKVENV AVRVELRNGC VGVG

```

ค

ภาพที่ 26 (ก) การ alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากรากลำไยกรรมวิธีปลูกเลี้ยงภายใต้ อุณหภูมิต่ำ (17/12°C) ต่ำด้วยโปรแกรม DNAMAN (ข) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ได้ จากรากลำไยกรรมวิธีปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ (17/12°C) (ค) ลำดับกรดอะมิโนของ ยีนที่ได้จากรากลำไยกรรมวิธีปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ (17/12°C) ต่ำ

ตารางที่ 11 ผลการสืบค้นความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากเนื้อเยื่อลำไยในกรรมวิธีต่างๆ กับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูลโดยโปรแกรม BLASTP 2.2.25

เนื้อเยื่อลำไย	พืช	โปรตีน	Identity (%)
ยอดลำไยกรรมวิธีราด KClO ₃ อัตรา 400 ppm	<i>Vitis vinifera</i>	hypothetical protein	66
ใบกรรมวิธีปลุกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ (17/12°C)	<i>Ricinus communis</i>	muconate cycloisomerases	72
รากชุดควบคุม	<i>Ricinus communis</i>	muconate cycloisomerases	73
รากกรรมวิธีราด KClO ₃ อัตรา 400 ppm	<i>Ricinus communis</i>	muconate cycloisomerases	70
รากกรรมวิธีปลุกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ (17/12°C)	<i>Ricinus communis</i>	muconate cycloisomerases	72

จากนั้นทำ multiple alignment ด้วยโปรแกรม CLUSTAL เวอร์ชัน 2.1 เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนจำนวน 9 ตัวอย่างที่สืบค้นจากข้อมูลในฐานข้อมูลที่ NCBI ได้แก่ ลำดับกรดอะมิโนของ *Vitis vinifera* (CBI15492.3, XP_002277056.1) ลำดับกรดอะมิโนของ *Sorghum bicolor* (XP_002455229.1) ลำดับกรดอะมิโนของ *Zea mays* (NP_001170642.1) ลำดับกรดอะมิโนของ *Oryza sativa Indica* (EAY72457.1) ลำดับกรดอะมิโนของ *Populus trichocarpa* (XP_002317902.1) ลำดับกรดอะมิโนของ *Ricinus communis* (XP_002528080.1, XP_002524895.1) และลำดับกรดอะมิโนของ *Arabidopsis thaliana* (NP_566605.1) ผลที่ได้จากการทำ multiple alignment แสดงดังภาพที่ 27 พบบริเวณอนุรักษ์ที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน F L V A P N V A R E L G และ G W G E ในลำดับกรดอะมิโนของเนื้อเยื่อลำไยกรรมวิธีต่างๆ รวมทั้งลำดับกรดอะมิโน 9 ตัวอย่างจากฐานข้อมูล

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

Vitis1      -----FKNLIETFTVDVQRAEGRPLNVPLIAPFTIA-SSRLERVE 86
Vitis2      -----FKNLIETFTVDVQRAEGRPLNVPLIAPFTIA-SSRLERVE 49
Sorghum     AISPSPSPPT----PVESFGFDALKETFSVDVAAADARPLDVPLAAPTIA-SSRLVAVS 103
Zea         AISPSPSPPTPA-SPEVFFGFDALKEAFSVDVAAADARS LDVPLAAPTIA-SSRLVAVS 107
Oryza       AVSPSPSPPTPPAPQPAETFGFDALKEAFSVDVAAEARPLNVPLAAPTIA-SSRLDAVS 110
Populus     -----FRDLMETFAVDVKRAENRPLNVPLIAPFTIA-SSRLDKVE 52
Ricinus2    -----FRDLMETLTVDERAENRPLNVPLIAPFTIA-SSRLDKVE 56
Arabidopsis PKSPITVMSKTS-----KFKILTENFTVRLKAENRELNVALLSPFTIA-SSRLDSVS 75
Ricinus1    STSVSTSSRSSE---RTNFGFKNLAETFWVDVQRAEGRPLNLELIAPLSVG-SKSVEEVE 116
RootControl -----FGFKNL TGTFWVDVQRAEGGALNVAL SEPLSVGP ITRLEKVE 89
LeafLowTemp -----FGFKNL TGTFWVDVQRAEGGALNVAL SEPLSVGP ITRLEKVE 89
BudKC103    -----FGFKNL TGTFWVDVQRAEGGALNVAL SEPLSVGP ITRLEKVE 81
RootKC103   -----FGFKDL TGTFWVDVQRAEGGALNVAL SEPLSVGP ITRLEKVE 83
RootLowTemp -----FGFKNL TGTFWVDVQRAEGGALNVAL SEPLSVGP ITRLEKVE 68
                * * : * * *: *:: * *::: . : *.

Vitis1      NVAIRIELKNGCVGWGEGPILPFVTAENQATAMAKAAEVCEVLRRRPAMTLGMLLGEIGE 146
Vitis2      NVAIRIELKNGCVGWGEGPILPFVTAENQATAMAKAAEVCEVLRRRPAMTLGMLLGEIGE 109
Sorghum     NVAVRVELRSGAVGWGEAPVLPVSVTAEDQPAALDAAGRA CAALE DASAAPLGALLQDVAS 163
Zea         NVAVRVELRTGAVGWGEAPVLPVSVTAEDQPAALDAAGRA CAALV GAPAAPLGAVLQDLAS 167
Oryza       NVAVRVELRSGAVGWGEAPVLPVSVTAEDQPGALAAATRA CGALAGAPAAPLGAVLQDVAS 170
Populus     NVAIRIELSDGCVGWGEGPILPFVTAEDQSTAMI KAREACELLKNSSSMKLGVLVLERVSE 112
Ricinus2    NVAIRIELSNGCAGWGETPILPFVTAEDQPTAMVKAREACELLKSSPMTLGS LLEKI GA 116
Arabidopsis NVAIRIELNDGFVWGEAPILPVSVAEDQIMAMVKAREASEFLRELPEMKLGNVLQEI GR 135
Ricinus1    NVAIRVELTNGCVGWGEVVPVFPVSVTAENHTVALAKAMEACEFLSCSSPMVLSVLSEIGG 176
RootControl NVAVRVELRNGCVGWGEDVDEF----- 111
LeafLowTemp NVAVRVELRNGCVGWGEV----- 107
BudKC103    NVAVRVELRNGCVGWGEAP----- 100
RootKC103   NVAVRVELRNGCVGWGEAT----- 102
RootLowTemp NVAVRVELRNGCVGWGE----- 85
                ***:*:** * .****

```

ภาพที่ 27 ผลการทำ multiple alignment ของลำดับกรดอะมิโนจำนวน 9 ตัวอย่างที่สืบค้นจากฐานข้อมูล กับลำดับกรดอะมิโนที่หาได้

(กำหนดให้ บริเวณสีเทา แทนตำแหน่งกรดอะมิโนที่คาดว่าเป็นบริเวณอนุรักษ์ (expectedly conserved regions) * แทนด้วย identical sequence : แทนด้วย conserved substitution และ . แทนด้วย semi-conserved substitution)

4.5 เนื้อเยื่อลำไยในกรรมวิธีต่างๆ และลำดับกรดอะมิโนของยีน

จากตารางที่ 12 แสดงกรรมวิธีที่สามารถหาลำดับกรดอะมิโนของยีนในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของลำไย ผลการทดลองพบว่าชุดควบคุมซึ่งลำไยไม่ออกดอกสามารถหาลำดับกรดอะมิโนเฉพาะในรากลำไยเท่านั้น ส่วนในกรรมวิธีกรด $KClO_3$ อัตรา 400 ppm สามารถหาลำดับกรดอะมิโนพบทั้งในยอด และในราก ส่วนกรรมวิธีปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ ($17/12^{\circ}C$) พบลำดับกรดอะมิโนในเนื้อเยื่อส่วนของใบ และรากของลำไย ซึ่งแตกต่างจากกรรมวิธีกรด $KClO_3$ อัตรา 400 ppm ที่พบในยอดลำไย

ตารางที่ 12 เนื้อเยื่อลำไยในกรรมวิธีต่างๆ และลำดับกรดอะมิโนที่หาได้

กรรมวิธี	การออกดอก	เนื้อเยื่อที่พบ	ลำดับกรดอะมิโน
ควบคุม	ไม่ออกดอก	ราก	1 SIELVLVLSP CVQRPRTLH RSQRIVKLCA VSNLMAESGV STTERTGFGF KNLTGTFWVD 61 VQRAEGGALN VALSEPLSVG PITRLEKVEN VAVRVELRNG CVGWGEDVDE F
กรรมวิธีรด $KClO_3$ อัตรา 400 ppm	ออกดอก	ยอด	1 TPCVQVRSRT LHRSQRIVKL CAVSNLMAES GVLTTERTGF GFKNLTGTFW VDVQRAEGGA 61 LNVALSEPLS VGPITRLEKV ENVAVRVELR NGCVG
กรรมวิธีปลูกเลี้ยง ภายใต้อุณหภูมิต่ำ (17/12°C)	ออกดอก	ราก	1 RFTPCVQVRS RTLHRSQRIV KLCVSNLMA ESGVSTTERT GFGFKDLTGT FWVDVQRAEG 61 GALNVALSEP LSVGPIIRLE KVENVAVRVE LRNGCVGW
		ใบ	1 SIELVHVLTP CVQVRSRTLH RSQRIVKLCA VSNLMAESGV STTERTGFGF KNLTGTFWVD 61 VQRAEGGALN VALSEPLSVG PITRLEKVEN VAVRVELRNG CVGWG
		ราก	1 SQRIVKLCAV SNLMAEPGVS TTERTGFGFK NLTGTFWVDV QRAEGGALNV ALSEPLSVG 61 ITRLEKVENV AVRVELRNGC VGWG

จากการศึกษาการจำแนกยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไซโตไคนนินชนิด *z* ในส่วนดา
ยอด ใบ และปลายรากภายหลังการชักนำการออกดอกด้วย $KClO_3$ และอุณหภูมิต่ำ สามารถสรุปเป็น
เบื้องต้นได้ว่า กรรมวิธีควบคุมซึ่งไม่ออกดอกจะสามารถหาลำดับกรดอะมิโนของยีนได้เฉพาะใน
ส่วนของปลายรากเท่านั้น ส่วนต้นลำไยที่ออกดอกเนื่องจากการชักนำของ $KClO_3$ จะสามารถหา
ลำดับกรดอะมิโนของยีนได้ทั้งในส่วนของยอด และปลายราก แต่การชักนำการออกดอกด้วยการ
ปลูกเลี้ยงในอุณหภูมิต่ำสามารถหาลำดับกรดอะมิโนได้ทั้งในส่วนของใบ และราก แต่ไม่พบในยอด