

การเปรียบเทียบผลของภาวะเค็มต่อเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตในข้าว *Oryza sativa* L.
พันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ทนเค็มที่เกิดจากมิวเทชัน



นางสาวณิกานต์ อุดมชโลทร

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

COMPARISON OF SALT STRESS EFFECTS ON CARBOHYDRATE METABOLISM IN LEUNG
PRATEW 123 RICE *Oryza sativa* L. AND THE SALT-TOLERANT MUTANT LINE



Miss Thanikarn Udomchalothorn

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Botany

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเปรียบเทียบผลของภาวะเค็มต่อเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตในข้าว <i>Oryza sativa</i> L. พันธุ์เหลืองประทิว 123 และสายพันธุ์ทนเค็มที่เกิดจากมิวเทชัน
โดย	นางสาวธนิษานต์ อุดมขไลทร
สาขาวิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.ปริดา บุญ-หลง

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์นันทนา อังกินันท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปริดา บุญ-หลง)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.กนกวรรณ เสรีภาพ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรพงษ์ บัวบูชา)

ธนิกันต์ อุดมชโลทร : การเปรียบเทียบผลของภาวะเค็มต่อเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 *Oryza sativa* L. และสายพันธุ์ทนเค็มที่เกิดจากมิวแทน. (COMPARISON OF SALT STRESS EFFECTS ON CARBOHYDRATE METABOLISM IN LEUNG PRATEW 123 RICE *Oryza sativa* L. AND THE SALT-TOLERANT MUTANT LINE) อ. ที่ปรึกษา: ผศ.ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์, อ.ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร.ปรีดา บุญ-หลง, 96 หน้า.

การศึกษามูลของภาวะเค็มต่อ การเติบโต ปริมาณคลอโรฟิลล์ การแสดงออกของยีน 6-phosphate,2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase (6PF2K/F26BPase) กิจกรรมของเอนไซม์ 6-phosphate,2-kinase (6PF2K) และเอนไซม์ fructose 2,6-bisphosphatase (F26BPase) ปริมาณแป้ง น้ำตาล ทั้งหมด ซูโครส และปริมาณของ fructose 2,6-bisphosphate (Fru-2,6-P₂) ในข้าวเหลืองประทิว123 สายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) และข้าวเหลืองประทิว123 สายพันธุ์เดิม (LPT123) พบว่าการให้ภาวะเค็มด้วยสารละลายธาตุอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5% เป็นเวลา 9 วันไม่มีผลต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ในข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ที่ทดสอบ อย่างไรก็ตามภาวะเค็มยับยั้งการเติบโตของข้าว LPT123 แสดงจากน้ำหนักแห้งที่ลดลง ในขณะที่ข้าว LPT123-TC171 สามารถเติบโตอย่างปกติตลอด 9 วันของการทดลองให้ภาวะเค็มซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการทนเค็มที่สูงกว่า ในภาวะเค็มข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยเกิดจากการเพิ่มของน้ำตาลซูโครสเป็นหลัก ในทางตรงข้ามภาวะเค็มส่งผลให้การสร้างแป้งลดลง อย่างไรก็ตามข้าวสายพันธุ์ทนเค็มในชุดการทดลองที่ให้ภาวะเค็มมีอัตราส่วนระหว่างซูโครสและแป้งสูงกว่าข้าวสายพันธุ์เดิม ในข้าวสายพันธุ์ทนเค็มพบสัญญาณการแสดงออกของยีน 6PF2K/F26BPase ภายหลังการให้ภาวะเค็มเป็นเวลา 12 ชั่วโมงในขณะที่ข้าว LPT123 ถูกชักนำให้มีการแสดงออกภายหลังการให้ภาวะเค็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งส่งผลให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ 6PF2K และเอนไซม์ F26BPase เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในข้าว LPT123-TC171 อัตราส่วนระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ 6PF2K/F26BPase ลดลงอย่างมีนัยสำคัญภายหลังการให้ภาวะเค็มเป็นเวลา 3 วัน เป็นผลให้ปริมาณของ Fru-2,6-P₂ ลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ ภายหลังการให้ภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วัน ข้อมูลดังกล่าวสนับสนุนบทบาทของ Fru-2,6-P₂ ที่ลดลงสามารถผลักดันให้เกิดการสังเคราะห์ซูโครสมากกว่าการสังเคราะห์แป้ง การศึกษานี้เสนอว่าคาร์บอนเมแทบอลิซึมอาจมีส่วนในความสามารถการทนเค็มของข้าว

ภาควิชา.....พฤกษศาสตร์.....ลายมือชื่อนิสิต.....ธนิกันต์ อุดมชโลทร
สาขาวิชา.....พฤกษศาสตร์.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....ศุภจิตรา ชัชวาลย์
ปีการศึกษา.....2550.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4772319923 : MAJOR BOTANY

KEY WORD: FRUCTOSE 2,6-BISPHOSPHATE/ RICE/ SALT STRESS

THANIKARN UDOMCHALOTHORN : COMPARISON OF SALT STRESS EFFECTS ON CARBOHYDRATE METABOLISM IN LEUNG PRATEW 123 RICE *Oryza sativa* L. AND THE SALT-TOLERANT MUTANT LINE. THESIS ADVISOR : ASST. PROF.SUPACHITRA CHADCHAWAN, Ph.D., THESIS COADVISOR: ASSOC, PROF. PREEDA BOON-LONG, Ph.D., 96 pp.

Growth, chlorophyll content, the expression pattern of 6-phosphate,2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase (*6PF2K/F26BPase*), 6-phosphate,2-kinase and fructose 2,6-bisphosphatase activities, and the contents of starch, total sugar, sucrose and fructose 2,6-bisphosphate (Fru-2,6-P₂) metabolite were determined in salt tolerant rice (*Oryza sativa* L.) line, LPT123-TC171, and its original rice cultivar, Leung Pratew 123 (LPT123). During 9 days of salt treatment, provided by addition of 0.5% NaCl in the nutrient solution, there was no effect on chlorophyll content in both rice cultivar/ line tested. However, salt stress inhibited growth of LPT123, showing by the reduction of dry weight, while LPT123-TC171 grew normally in that condition during 9 days of salt-stress period, suggesting the more salt tolerance ability. Under the saline condition, both rice cultivar / line significantly increased in total soluble sugar, mainly sucrose, but decreased in the proportion of carbon assimilated to starch. However, the salt tolerant LPT123-TC171 showed higher sucrose/starch ratio than its original cultivar. In the salt tolerant, the transcription level of *6PF2K/F26BPase* was temporarily increased after 12 hour of salt treatment, while LPT123 was found to be up-regulated after 24 hour of stress, which resulted in the increase of both 6-phosphate, 2-kinase and fructose 2,6-bisphosphatase activities. Only LPT123-TC171 showed the significant reduction of 6-phosphate, 2-kinase / fructose 2,6-bisphosphatase activity ratio after 3 days of salt treatment, leading to the significant reduction of Fru-2,6-P₂ content after 9 days in salt-stress condition. These data supported the role of Fru-2,6-P₂ reduction in partition more carbon to sucrose. This research suggested that carbon metabolism may contribute to salt-stress tolerance ability in rice.

Department.....Botany..... Student's signature *Thanikarn Udomchalothorn*
 Field of study.....Botany..... Advisor's signature *Supachitra Chadchawan*
 Academic year.....2007..... Co-advisor's signature *[Signature]*

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา บุญ-หลง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำสั่งสอน คำแนะนำและความช่วยเหลือ ตลอดจนการทำวิจัยและตรวจแก้วิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์นันทนา อังกินันท์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.กนกวรรณ เสรีภาพ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรพงษ์ บัวนุชา กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้วิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ กิติคุณ ดร.ถาวร วัชรภักย์ และศาสตราจารย์ กิติคุณ มณฑกานติ วัชรภักย์ ที่กรุณาเอื้อเฟื้อเมล็ดพันธุ์ข้าวเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัย

ขอขอบคุณ โครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) สำหรับทุนการศึกษา และเงินทุนสนับสนุนการวิจัยทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

ขอขอบคุณ คุณรุปรุภา บางยี่ขัน คุณสหัส จันทนาอรพินท์ คุณชัชวาล วงศ์ชัย สำหรับความช่วยเหลือ คำแนะนำ และข้อคิดเห็น ตลอดจนการทำวิจัย คุณหทัยกาญจน์ สิทธา คุณยศเวช สิริจามร คุณหนึ่งฤทัย คณานนท์ คุณพานิษา พรเพ็ญภักดี คุณศิริพร ศรีวิญญูวณิช คุณปรมिता พันธุ์วงศ์ คุณปฐมฤกษ์ อิงสันเทียะ คุณอรทัย พงศ์วัชรธรรม คุณนิรานี บินนิมะ และทุกท่านในภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือและกำลังใจตลอดการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่และครอบครัว ที่เป็นกำลังใจและสนับสนุนเป็นอย่างดีตลอดการทำวิทยานิพนธ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. การตรวจเอกสาร.....	4
ภาวะเค็มกับการเจริญเติบโตของพืช.....	4
การปรับตัวของพืชภายใต้ภาวะเค็ม.....	5
หน้าที่ของ fructose 2,6-bisphosphate ในเซลล์พืช.....	6
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	9
พืชทดลอง.....	9
สถานที่ปลูกพืชทดลอง.....	9
ช่วงเวลาทำการทดลอง.....	9
อุปกรณ์การศึกษา.....	10
สารเคมี.....	15
วิธีการทดลอง.....	20
4. ผลการทดลอง.....	28
1. การศึกษาผลของภาวะเค็มต่อการเติบโตของข้าวและปริมาณ คลอโรฟิลล์ในใบข้าว.....	28
1.1 การศึกษาผลของภาวะเค็มต่อการเติบโตของข้าว.....	28
1.2 การศึกษาผลของภาวะเค็มต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ ในใบข้าว.....	29

2. ผลของความเค็มที่มีต่อปริมาณแป้ง น้ำตาลทั้งหมด และน้ำตาลซูโครสในใบข้าว.....	35
2.1 แป้ง.....	35
2.2 น้ำตาลทั้งหมด.....	35
2.3 น้ำตาลซูโครส.....	36
2.4 อัตราส่วนระหว่างแป้งและน้ำตาลซูโครส.....	36
3. การศึกษาชีววิทยาระดับโมเลกุลของยีน 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase.....	45
3.1 การศึกษา organization ของยีน 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase ในจีโนมของข้าว...	45
3.2 การศึกษาแสดงออกของยีน 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase หลังจากได้รับภาวะเค็ม.....	45
4. ผลของภาวะเค็มต่อกิจกรรมของเอนไซม์ 6-phosphofructo-2-kinase เอนไซม์ fructose 2,6-bisphosphatase และ ปริมาณ fructose-2,6-bisphosphate.....	49
4.1 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ 6-phosphofructo-2-kinase และเอนไซม์ fructose 2,6-bisphosphatase.....	49
4.2 การศึกษาปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate.....	49
5. อภิปรายการทดลอง.....	56
1. การศึกษาผลของภาวะเค็มต่อการเติบโตของข้าวและปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบข้าว.....	56
2. ผลของความเค็มที่มีต่อปริมาณแป้ง น้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลซูโครสในใบข้าว.....	59
3. การศึกษาชีววิทยาระดับโมเลกุลของยีน 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase.....	61

บทที่

4. ผลของภาวะเค็มต่อกิจกรรมของเอนไซม์ 6-phosphofructo-2-kinase เอนไซม์ fructose 2,6-bisphosphatase และปริมาณ fructose-2,6-bisphosphate.....	64
6. สรุปผลการทดลอง.....	67
รายการอ้างอิง.....	70
ภาคผนวก.....	77
ภาคผนวก ก.....	78
ภาคผนวก ข.....	83
ภาคผนวก ค.....	92
ภาคผนวก ง.....	94
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	96



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1. น้ำหนักสดของข้าวเหลืองประทิว123 และ เหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 %(W/V) เป็นเวลา 9วัน.....	30
2. น้ำหนักแห้งของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 %(W/V) เป็นเวลา 9 วัน.....	31
3. ปริมาณคลอโรฟิลล์ของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 %(W/V) เป็นเวลา 9 วัน.....	32
4. ปริมาณแป้งในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 %(W/V) เป็นเวลา 9 วัน.....	37
5. ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 %(W/V) เป็นเวลา 9 วัน.....	38
6. ปริมาณน้ำตาลซูโครสในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 %(W/V) เป็นเวลา 9 วัน.....	39
7. ปริมาณน้ำตาลที่เป็น non-sucrose sugar ในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลงWP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 %(W/V) เป็นเวลา 9 วัน.....	40
8. อัตราส่วนระหว่างน้ำตาลซูโครสและแป้งของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 %(W/V) เป็นเวลา 9 วัน.....	41
9. กิจกรรมของเอนไซม์ 6-phosphofructo 2-kinase ในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 %(W/V) เป็นเวลา 9 วัน.....	50

ตาราง	หน้า
10. กิจกรรมของเอนไซม์ fructose 2,6-bisphosphatase ในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 %(W/V) เป็นเวลา 9 วัน.....	51
11. อัตราส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ 6-phosphofructo 2-kinase/ fructose 2,6-bisphosphatase ในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว 123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 %(W/V) เป็นเวลา 9 วัน.....	52
12. ปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate ในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 %(W/V) เป็นเวลา 9 วัน.....	53

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
1. น้ำหนักสดของต้นข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5% (W/V) เป็นเวลา 9 วัน.....	33
2. น้ำหนักแห้งของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 % (W/V) เป็นเวลา 9 วัน.....	33
3. ปริมาณคลอโรฟิลล์ของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 % (W/V) เป็นเวลา 9 วัน.....	34
4. ปริมาณแป้งในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 % (W/V) เป็นเวลา 9 วัน.....	42
5. ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว 123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 % (W/V) เป็นเวลา 9 วัน.....	42
6. ปริมาณน้ำตาลซูโครสในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว 123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 % (W/V) เป็นเวลา 9 วัน.....	43
7. ปริมาณน้ำตาลที่เป็น non-sucrose sugar ในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว 123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 % (W/V) เป็นเวลา 9 วัน.....	43
8. อัตราส่วนระหว่างน้ำตาลซูโครสและแป้งของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 % (W/V) เป็นเวลา 9 วัน.....	44
9. Southern blot analysis ของข้าวเหลืองประทิว123 และ ข้าวเหลืองประทิว123-TC171.....	47
10. รูปแบบการแสดงออกของยีน <i>6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase</i> เมื่ออยู่ภาวะเค็ม.....	48

ภาพประกอบ	หน้า
11. กิจกรรมของเอนไซม์ 6-phosphofructo 2-kinase ในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 %(W/V) เป็นเวลา 9 วัน.....	54
12. กิจกรรมของเอนไซม์ fructose 2,6-bisphosphatase ในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 %(W/V) เป็นเวลา 9 วัน.....	54
13. อัตราส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ 6-phosphofructo 2-kinase/ fructose 2,6-bisphosphatase ในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว 123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5% (W/V) เป็นเวลา 9 วัน.....	55
14. ปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate ในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 %(W/V) เป็นเวลา 9 วัน.....	55
15. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate และอัตราส่วนของน้ำตาลซูโครสและแป้งของข้าวเหลืองประทิว123 และ เหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น0.5 %(W/V) เป็นเวลา 9 วัน.....	66
16. ข้าวเหลืองประทิว123 และ ข้าวเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกเลี้ยงในสารละลายธาตุอาหารสูตร WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5% (W/V) เป็นเวลา 9 วัน.....	93

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ภาวะเค็มส่งผลกระทบต่อ ลักษณะทางกายภาพ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา รวมถึงเมแทบอลิซึมของพืช ดังนั้นเมื่ออยู่ภายใต้ภาวะเค็ม พืชจำเป็นต้องมีกลไกการปรับตัวเพื่อให้สามารถดำรงชีวิตในสิ่งแวดล้อมนี้ได้ การปรับตัวดังกล่าวเป็นผลจากการควบคุมการแสดงออกของยีนในพืช ซึ่งโปรตีนที่มาจาก การแสดงออกของยีนดังกล่าวนั้นอาจทำหน้าที่เป็นองค์ประกอบของการส่งสัญญาณภายในเซลล์ หรือเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการปกป้องเซลล์โดยตรง เช่น ทำหน้าที่ในกระบวนการสังเคราะห์สาร osmolyte (Kawasaki และคณะ, 2001)

จากการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และสายพันธุ์ทนเค็มเหลืองประทิว 123-TC171 ภายใต้ภาวะเค็มโดยใช้เทคนิค differential display พบยีนส่วนยีนขนาด 152 เบส ที่มีความคล้ายกับยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* ในจีโนมข้าว สัญญาณการแสดงออกของยีนดังกล่าวในข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ มีรูปแบบการแสดงออกแตกต่างกัน ในข้าวเหลืองประทิว123 ไม่พบการแสดงออกในภาวะปกติ แต่ภายหลังได้รับภาวะเค็มโดยการให้โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่งผลให้ยีนดังกล่าวแสดงออกเพิ่มสูงขึ้น สำหรับยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* ในข้าวเหลืองประทิว123-TC171 สามารถตรวจพบการแสดงออกเมื่ออยู่ในภาวะปกติและแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นภายหลังได้รับภาวะเค็ม (สมพร มณีประสพสุข, 2547) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองใน *Bruguiera gymnorrhiza* ซึ่งพบว่าการแสดงออกของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* เพิ่มสูงขึ้นหลังได้รับภาวะเค็ม ในพืชดังกล่าวพบว่ามีการรวมของเอนไซม์ *6-phosphofructo-2-kinase* เพิ่มขึ้นในขณะที่การทำงานของเอนไซม์ *fructose 2,6-bisphosphatase* ลดลง จึงส่งผลให้ปริมาณของ *fructose 2,6-bisphosphate* สูงขึ้น หลังได้รับโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 500 mM เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (Banzai และคณะ, 2003) อย่างไรก็ตามการศึกษาใน *Bruguiera gymnorrhiza* ไม่ได้ระบุถึงความสำคัญในการเพิ่มขึ้นของ *fructose 2,6-bisphosphate* ว่ามีความสัมพันธ์อย่างไรกับการปรับตัวภายใต้สภาวะเค็ม

fructose 2,6-bisphosphate ถูกสร้างและสลายโดยกิจกรรมของเอนไซม์ 6-phosphofructo-2-kinase (EC 2.7.1.105) และ fructose 2,6-bisphosphatase (EC 3.1.3.46) ตามลำดับ (Nielsen และคณะ, 2004) การตรวจสอบหน้าที่ของ fructose 2,6-bisphosphate โดยใช้พืชตัดแปลงพันธุกรรม จากการถ่ายยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* เข้าในต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum* L.) เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของ metabolite ของพืชตัดแปลงพันธุกรรม พบว่า fructose 2,6-bisphosphate ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมทิศทางของ carbon flux ในกระบวนการสังเคราะห์แป้งและน้ำตาลซูโครส (Scott และคณะ, 1995; Scott และคณะ, 2000) เนื่องจากทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ cytosolic fructose 1,6-bisphosphatase (EC 3.1.3.11) และ pyrophosphate-dependent phosphofructokinase (EC 2.7.1.90) (Nielsen และคณะ, 2004)

ภาวะเค็มส่งผลถึงเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ซึ่งมีความสำคัญต่อการปรับตัวของพืช (Geigenberger และคณะ, 1997) จึงเป็นไปได้ว่าการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* เป็นยีนที่มีหน้าที่ควบคุมเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตในยูคาริโอต (Nielsen และคณะ, 2004) การชักนำการแสดงออกของยีนดังกล่าวภายหลังจากที่พืชได้รับภาวะเค็ม อาจเป็นการปรับตัวเพื่อรักษาสมดุลของเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ภายใต้ภาวะเค็ม ส่งผลให้พืชสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในภาวะเครียด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* อัตราส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ 6-phosphofructo-2-kinase และ เอนไซม์ fructose 2,6-bisphosphatase และปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate ซึ่งเป็นผลผลิตของเอนไซม์ ต่อการเปลี่ยนแปลงการสะสมแป้งและน้ำตาลซูโครส ในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ซึ่งทั้งสองเป็นข้าวที่มีพื้นฐานทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน แต่มีความสามารถในการทนเค็มแตกต่างกัน (Thikart และคณะ, 2005) การศึกษาในเชิงเปรียบเทียบเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตในข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ เมื่อได้รับภาวะเค็มจะนำไปสู่การสร้างความเข้าใจกลไกของการควบคุมเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตในภาวะเค็ม เพื่อการไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวทนเค็มในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

การศึกษาในเชิงเปรียบเทียบเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตในข้าว ภายใต้ภาวะเครียดที่เกิดจากความเค็ม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับกลไกการตอบสนองต่อภาวะเค็มของข้าวในระดับเซลล์มุ่งประเด็นการศึกษาไปที่การปรับเปลี่ยนรูปแบบของคาร์โบไฮเดรต ภายใต้ภาวะเครียดที่เกิดจากความเค็ม โดยเลือกใช้ข้าวสองพันธุ์/สายพันธุ์ ที่มีความทนทานต่อภาวะเค็มแตกต่างกัน แต่มีพื้นฐานทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน ทำให้สามารถระบุกลไกในการทนเค็มของพืชได้อย่างชัดเจนนำไปสู่การประยุกต์และการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวทนเค็มในอนาคต

ขอบเขตของการวิจัย

1. การศึกษาผลของภาวะเค็มต่อการเติบโตของข้าวและปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบข้าว
2. การศึกษาผลของภาวะเค็มที่มีต่อปริมาณแป้ง น้ำตาลทั้งหมด และน้ำตาลซูโครสในใบข้าว
3. การศึกษาชีววิทยาระดับโมเลกุลของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase*
4. การศึกษาผลของภาวะเค็มต่อกิจกรรมของเอนไซม์ *6-phosphofructo-2-kinase* เอนไซม์ *fructose 2,6-bisphosphatase* และ ปริมาณ *fructose-2,6-bisphosphate*

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ภาวะเค็มกับการเจริญเติบโตของพืช

ดินเค็มหมายถึงดินที่มีปริมาณเกลือที่ละลายน้ำได้มากเกินไป เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและปริมาณผลผลิตของพืช (Mansour และ Salama, 2004) ภาวะเค็มส่งผลกระทบต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาภายในต้นพืช เนื่องจากพืชไม่สามารถนำน้ำไปใช้ประโยชน์ได้ ทำให้เกิดภาวะขาดน้ำภายในเซลล์ อีกทั้งเซลล์พืชสูญเสียความสามารถในการสะสมดุลของไอออนภายในเซลล์ ทำให้มีการสะสมไอออนและคลอไรด์ไอออนมากเกินไปจากการศึกษาผลกระทบในระดับเซลล์เมื่อพืชได้รับภาวะเค็มพบว่าไอออนและคลอไรด์ไอออนที่มากเกินไปนั้นจะเข้าทำลายโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนทำให้โปรตีนเสียสภาพ (Neumann, 1997) รวมถึงการลดลงของโพแทสเซียมไอออนและแคลเซียมไอออนภายในเซลล์ ส่งผลกระทบต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ (Greenway และ Munns, 1980) ดังนั้นเซลล์พืชจำเป็นต้องมีกลวิธีปรับสมดุลของไอออนเพื่อให้สามารถอยู่รอดได้ในภาวะเค็ม เช่น การกำจัดไอออนและคลอไรด์ไอออนส่วนเกินออกจากไซโตพลาสซึม และรักษาระดับความเข้มข้นของโพแทสเซียมไอออนและแคลเซียมไอออนให้อยู่ในระดับที่เซลล์สามารถมีกิจกรรมได้ตามปกติ (Serrano และคณะ, 2001) นอกจากความเป็นพิษของไอออนแล้วภาวะเค็มส่งผลให้พืชมีการปิดปากใบมากขึ้น เป็นผลให้ความต้านทานบริเวณปากใบสูงขึ้น ยับยั้งการแพร่เข้าของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ส่งผลให้การสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชลดลง (Sibole และคณะ, 1998) อีกทั้งการได้รับภาวะเค็มอย่างรุนแรงหรือเป็นเวลานาน ส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลงเนื่องจากภาวะเค็มกระตุ้นให้ปริมาณ reactive oxygen species ในคลอโรพลาสต์เพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้ไทลาคอยด์เมมเบรนถูกทำลาย (Hernandez และคณะ, 1999) คลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุที่มีบทบาทในการดูดกลืนพลังงานแสงซึ่งมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช ดังนั้นเมื่อคลอโรฟิลล์ถูกทำลายกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงจึงถูกยับยั้ง (Lu และคณะ, 2002) อย่างไรก็ตามการที่พืชมีการลดปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ อาจเป็นเพราะเป็นการลดปริมาณการดูดกลืนแสงที่มากเกินไป จัดเป็นการตอบสนองเพื่อเป็นการป้องกันการเกิด photoinhibition (Morales และคณะ, 2006)

การปรับตัวของพืชภายใต้ภาวะเค็ม

ในภาวะเค็มสารละลายภายนอกมีไอออนของเกลือสูง ทำให้เกิดความเป็นพิษของไอออนที่ดูดซึมเข้าไป ซึ่งมักเกิดจากโซเดียมและคลอไรด์ไอออน (Greenway และ Munns, 1980) ดังนั้นเซลล์พืชจำเป็นต้องมีปรับสมดุลของไอออนเพื่อให้สามารถอยู่รอดได้ในภาวะเค็ม คือการกำจัดโซเดียมไอออนและคลอไรด์ไอออนส่วนเกินออกจากไซโตพลาสซึม และรักษาระดับความเข้มข้นของโพแทสเซียมไอออนและแคลเซียมไอออนให้อยู่ในระดับที่เซลล์สามารถมีกิจกรรมได้ตามปกติ (Mansour และคณะ, 2003) เยื่อหุ้มเซลล์ และ tonoplast มีบทบาทสำคัญที่จะรักษาสภาพดังกล่าวไว้ เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์และ tonoplast มีกลุ่มของโปรตีนที่ทำหน้าที่ลำเลียงสารต่างๆ (Transport system protein) จัดเรียงตัวอยู่ โดยคาดว่าโปรตีนกลุ่มนี้มีความสำคัญต่อการรักษาสมดุลของไอออนภายใต้ภาวะเค็ม และน่าจะมีความสัมพันธ์กับการปรับตัวของพืชในภาวะเค็มด้วย (Hasegawa และคณะ, 2000)

ในภาวะเค็มสารละลายภายนอกมีค่า water potential ต่ำ ส่งผลให้พืชดูดซึมน้ำไปใช้ได้ยาก (Taiz และ Zeiger, 2006) ทำให้พืชจำเป็นต้องเกิดการปรับตัวเช่นลดพื้นที่ใบและหรีปากใบเพื่อเป็นการลดการสูญเสียน้ำ (Reddy และคณะ, 2004) ในขณะเดียวกันพืชจำเป็นต้องปรับค่า water potential ภายในเซลล์ให้ลดต่ำลง ดังนั้นการสะสมสาร osmolyte จัดเป็นการปรับตัวหนึ่งของพืชเมื่ออยู่ในภาวะเค็ม โดยสาร osmolyte เป็นสารอินทรีย์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ มีการสังเคราะห์สารเหล่านี้เพิ่มสูงขึ้นเมื่อพืชอยู่ในภาวะ osmotic stress โดยสาร osmolyte ที่พืชสร้างได้แก่ น้ำตาล polyol และกรดอะมิโน (Hare และคณะ, 1998) นอกจากนี้หน้าที่ในกระบวนการปรับค่า water potential ภายในเซลล์ (Xiong และ Zhu, 2002) แล้วยังทำหน้าที่ในกระบวนการ osmoprotection ช่วยในการรักษาโครงสร้างภายในเซลล์เช่น เซลล์เมมเบรน และโปรตีน (Street และคณะ, 2006)

น้ำตาลซูโครสเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีความสำคัญ เนื่องจากเป็นรูปแบบของน้ำตาลที่ลำเลียงไปยังส่วนต่างๆ เป็นรูปแบบของน้ำตาลที่เก็บสะสม และเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของพืช (Leegood, 1999) อีกทั้งมีส่วนในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนบางกลุ่ม ดังนั้นจึงเป็นโมเลกุลที่มีความสำคัญในการเจริญเติบโตของพืช (Winter และ Huber, 2000) กระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสเกิดขึ้นบริเวณไซโตพลาสซึม โดยปฏิกิริยาการเปลี่ยน UDP-glucose และ fructose 6-phosphate เป็น sucrose 6-phosphate ซึ่งควบคุมด้วยเอนไซม์ sucrose phosphate synthase และเป็น rate-limiting step ของการสังเคราะห์ซูโครส (Leegood, 1999)

ภายใต้ภาวะเครียดที่เกิดจากความเค็มและความแล้งสามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ sucrose phosphate synthase ให้เพิ่มสูงขึ้น (Quick และคณะ, 1989) กิจกรรมของเอนไซม์ sucrose phosphate synthase สามารถถูกควบคุมจากหลายปัจจัย นอกจากควบคุมด้วยความเข้มข้นของสารตั้งต้น และผลิตภัณฑ์แล้ว (Leegood, 1999) ภาวะเค็มและภาวะแล้งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลให้เอนไซม์ sucrose phosphate synthase เกิด phosphorylation ของกรดอะมิโน serine ตำแหน่งที่ 424 (Torocer และ Huber, 1997) ทำให้โปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามมิติ อยู่ในรูป active form ดังนั้นเมื่ออยู่ในภาวะเค็มและภาวะแล้ง เอนไซม์จึงมีกิจกรรมที่สูงขึ้นกว่าภาวะปกติหลายเท่า จึงสามารถกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสเพิ่มขึ้น (Winter และ Huber, 2000) โดยพบว่าในภาวะ osmotic stress พืชหลายชนิดมีการสะสมน้ำตาลซูโครสสูงขึ้นเช่นใน *Phaseolus vulgaris* (Vassey และ Sharkey, 1989) spinach (*Spinacia oleracea* L.) (Quick และคณะ, 1989) *Atriplex halimis* L. (Martinaz และคณะ, 2004) มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) (Geigerberger และคณะ, 1997) รวมถึงในข้าว (*Oryza sativa* L.) (Garcia และคณะ, 1997)

หน้าที่ของ fructose 2,6-bisphosphate ในเซลล์พืช

fructose 2,6-bisphosphate จัดเป็น cellular signal molecule ที่สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงทุกกลุ่ม โดยปริมาณของ fructose 2,6-bisphosphate ภายในเซลล์ถูกควบคุมด้วยกิจกรรมของเอนไซม์ fructose 6-phosphate,2-kinase และเอนไซม์ fructose 2,6-bisphosphatase ซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์และสลายโมเลกุล fructose 2,6-bisphosphate ตามลำดับ ทั้งสองเอนไซม์มีลักษณะเป็น bifunctional enzyme เป็นยีนเดียวกัน อยู่บนสายโพลีเปปไทด์เดียวกันแต่มีส่วน catalytic site ต่างบริเวณ (Nielsen และคณะ, 2004) หน้าที่ที่สำคัญของ fructose 2,6-bisphosphate คือควบคุมขั้นตอนการเปลี่ยน fructose 6-phosphate ไปเป็น fructose 1,6-bisphosphate เนื่องจากโมเลกุลของ fructose 2,6-bisphosphate สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ pyrophosphate-dependent phosphofructokinase อีกทั้งเป็นตัวยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase (Nielsen และคณะ, 2004; Stitt, 1990a)

1. Cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase (EC 3.1.3.11)

การควบคุมการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสมีความจำเป็นและมีความสำคัญ เนื่องจากการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสสัมพันธ์กับกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อหมุน inorganic phosphate (Pi) เข้าไปในคลอโรพลาสต์เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสง และเนื่องจากการสังเคราะห์แป้งและน้ำตาลซูโครสใช้สารเริ่มต้นในการสังเคราะห์ร่วมกันคือ triose phosphate ซึ่งได้จากการสังเคราะห์ด้วยแสง ดังนั้นโมเลกุลของ triose phosphate จึงเป็นจุดแยกที่สำคัญของการ partitioning photosynthate ระหว่างแป้งและน้ำตาลซูโครส (Stitt, 1990b) โดยเอนไซม์ cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase ประกอบด้วยหน่วยย่อย 4 หน่วย ที่มีขนาด 37 kD เอนไซม์ดังกล่าวควบคุมปฏิกิริยา dephosphorylation ของ fructose 1,6-bisphosphate เป็น fructose-6-phosphate ซึ่งเป็น irreversible step ขั้นแรกของการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครส ดังนั้นในขั้นตอนนี้เป็นการควบคุมการลำเลียง triose phosphate จากคลอโรพลาสต์โดยเอนไซม์ cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase สามารถถูกยับยั้งการทำงานโดย fructose 2,6-bisphosphate พบว่า fructose 2,6-bisphosphate ที่ความเข้มข้นต่ำก็สามารถส่งผลกระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์ cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase ได้ (Stitt, 1990a)

2. Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase (EC 2.7.1.90)

เอนไซม์ pyrophosphate-dependent phosphofructokinase ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วย แต่ละหน่วยย่อยมีมวลโมเลกุลประมาณ 60 และ 67 kD โดยเอนไซม์ pyrophosphate-dependent phosphofructokinase ควบคุมปฏิกิริยาผันกลับระหว่าง fructose-1,6-bisphosphate และ fructose-6-phosphate (Stitt, 1990a) fructose-1,6-bisphosphate สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ pyrophosphate-dependent phosphofructokinase ได้ทั้งในปฏิกิริยาไปข้างหน้า (fructose-1,6-bisphosphate forming) และในปฏิกิริยาย้อนกลับ (fructose-6-phosphate forming) ในสภาพ *in vivo* ทั้งสองปฏิกิริยาอยู่ในสภาพสมดุล เมื่อนำปริมาณของ fructose-1,6-bisphosphate fructose-6-phosphate pyrophosphate และ Pi พบว่ามีค่าใกล้เคียงเมื่อเทียบกับค่า mass action ratio ปฏิกิริยาจึงอยู่ในสมดุลดังนั้นจึงยากต่อการทำนายทิศทางของปฏิกิริยา (Stitt, 1990b)

การศึกษาหน้าที่ของ fructose 2,6-bisphosphate โดยการใช้พืชตัดแปลงพันธุกรรมที่มีปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate สูงกว่าในพืชปกติพบว่าปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate ที่สูงขึ้นส่งผลให้พืชเกิดการสะสมแป้งในคลอโรพลาสต์เพิ่มขึ้น และมีปริมาณน้ำตาลซูโครสในเซลล์ลดลง (Scott และคณะ, 1995) ในทางตรงข้ามผลจากการศึกษาในพืชตัดแปลงพันธุกรรมที่มีปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate ลดต่ำกว่าในพืชปกติ พบว่านอกจากส่งผลให้เกิดจากลำเลียงผลผลิตจากการสังเคราะห์ด้วยแสงมายังไซโตพลาสซึมเพื่อสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสแล้ว ยังส่งผลให้พืชตัดแปลงพันธุกรรมสังเคราะห์กรดอะมิโนเพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate ภายในเซลล์ไม่เพียงส่งผลถึงการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสและแป้ง แต่ยังเป็นตัวประสานการทำงานระหว่างคลอโรพลาสต์และไซโตพลาสซึม (Scott และคณะ, 2000) Nielsen และคณะ (2004) ได้เสนอว่าหน้าที่ของ fructose 2,6-bisphosphate มีบทบาทที่สำคัญในการปรับตัวของพืชที่อยู่ในภาวะเค็ม ผ่านการควบคุมเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตของพืช



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

พืชทดลอง

1. ข้าว (*Oryza sativa* L.) พันธุ์เหลืองประทิว123
2. ข้าว (*Oryza sativa* L.) สายพันธุ์ทนเค็มเหลืองประทิว123-TC171 ซึ่งคัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 ในหลอดทดลอง ผ่านการคัดเลือกพันธุ์ และผสมตัวเอง โดยการคัดเลือกภายใต้ภาวะเค็มมา 7ชั่วรุ่น (Vajrabhaya และ Vajrabhaya, 1991)

ข้าวเหลืองประทิว123 และข้าวเหลืองประทิว123-TC171 ซึ่งเป็นข้าวที่มีความสามารถในการทนเค็ม (ธนะกาญจน์ มัญชุพาทณี, 2543) และความสามารถในการทนแล้งแตกต่างกัน และเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี RAPD พบว่าข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ มีความแตกต่างกันในระดับพันธุกรรมอีกด้วย (Thikart และคณะ, 2005)

สถานที่ปลูกพืชทดลอง

โรงเรียนปฏิบัติการวิจัยข้าว หน่วยปฏิบัติการวิจัยสิ่งแวดล้อม และสรีรวิทยาของพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ช่วงเวลาที่ทำการทดลอง

ทำการปลูกข้าวระหว่างเดือน มีนาคม-ตุลาคม 2549 โดยทำการวัดอุณหภูมิและความเข้มแสงระหว่างเวลา 8.00-17.30 น. พบว่าอุณหภูมิเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 21.97-23.12 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยอยู่ระหว่าง 74.12-81.81% และมีความเข้มแสงเฉลี่ยภายในโรงเรียนเพาะข้าวอยู่ระหว่าง 92.79-99.18 $\mu\text{mole photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$

อุปกรณ์การศึกษา

1. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ปลูกข้าว
 - กระบะพลาสติกขนาด 50X100 ตารางเซนติเมตร
 - ขวดแก้วขนาด 100 มิลลิลิตร
 - เครื่องวัดการนำไฟฟ้า (digital electroconductivity meter)
2. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาการเติบโตของพืช
 - กรรไกร
 - อลูมิเนียมฟอยด์
 - เครื่องชั่งตวงวัด 4 ตำแหน่งในหน่วยกรัม
 - ตัวอย่างพืช
3. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดและวัดปริมาณคลอโรฟิลล์
 - cuvette
 - โกร่งบด
 - เครื่องชั่งตวงวัด 4 ตำแหน่งของหน่วยกรัม
 - เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง
 - หลอด microcentrifuge
 - อลูมิเนียมฟอยด์
4. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดแป้งและน้ำตาล
 - cuvette
 - volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร
 - เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน
 - เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง
 - อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

— อลูมินัมฟอยล์

5. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด genomic DNA ข้าว

— cuvette

— โกร่งบด

— เครื่องกำเนิดแสง UV และถ่ายภาพเจล (Gel Doc™2000, BIO-RAD)

— เครื่องเขย่าผสมสาร

— เครื่องตั้งเทคนิค 4 ตำแหน่งของหน่วยกรัม

— เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน

— เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนชนิดควบคุมอุณหภูมิ

— เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง

— ชุดแยกกรดนิวคลีอิกด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวระนาบ (horizontal gel electrophoresis)

— ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่างอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

— ไมโครปิเปต

— หลอด microcentrifuge

— อลูมินัมฟอยล์

— อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

6. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ทำ Southern blot analysis

— X-ray film (Kodak (Australia) PTY, LYD., Australia)

— X-ray Hypercassette™ (Amersham Pharmacia Biotech UK limited, UK)

— กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman paper)

— กระดาษหนังสือพิมพ์

— กล่องพลาสติกขนาด 15X30 และ 12X15 ตารางเซนติเมตร

— เครื่องกำเนิดแสง UV และถ่ายภาพเจล (Gel Doc™2000, BIO-RAD)

— เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน

- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนชนิดควบคุมอุณหภูมิ
- เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง
- ชุดแยกกรดนิวคลีอิกด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวระนาบ
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิสำหรับทำ hybridization
- ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่างอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส
- ตู้อบอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส
- แผ่นเมมเบรน (hybond N⁺, Amersham Pharmacia Biotech UK limited, UK)
- ไมโครปิเปต
- ไม้บรรทัด
- หลอด microcentrifuge

7. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด plasmid DNA

- microwave oven
- pH meter
- เครื่องกำเนิดแสง UV
- เครื่องกำเนิดแสง UV และถ่ายภาพเจล (Gel Doc™2000, BIO-RAD)
- เครื่องเขย่าผสมสาร
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน
- เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง
- ชุดแยกกรดนิวคลีอิกด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวระนาบ
- ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่างอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส
- ไมโครปิเปต
- หลอด microcentrifuge
- หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ

8. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด RNA ข้าว

- cuvette
- โกร่งบด
- เครื่องกำเนิดแสง UV และถ่ายภาพเจล (Gel Doc™2000, BIO-RAD)
- เครื่องเขย่าผสมสาร
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่งของหน่วยกรัม
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนชนิดควบคุมอุณหภูมิ
- เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง
- ชุดแยกกรดนิวคลีอิกด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวระนาบ
- ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่างอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส
- ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่างอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
- ไมโครปิเปต
- หลอด microcentrifuge
- อลูมิเนียมฟอยล์
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

9. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี northern blot analysis

- X-ray film (Kodak (Australia) PTY, LYD., Australia)
- X-ray Hypercassette™ (Amersham Pharmacia Biotech UK limited, UK)
- เครื่องกำเนิดแสง UV และถ่ายภาพเจล (Gel Doc™2000, BIO-RAD)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนชนิดควบคุมอุณหภูมิ
- เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง
- แผ่นเมมเบรน (hybond N⁺, Amersham Pharmacia Biotech UK limited, UK)
- ไมโครปิเปต

- ไม้บรรทัด
- กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman paper)
- กระดาษหนังสือพิมพ์
- กล้องพลาสติกขนาด 15X30 และ 12X15 ตารางเซนติเมตร
- ชุดแยกกรดนิวคลีอิกด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวระนาบ
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิสำหรับทำ hybridization
- ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่างอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส
- ตู้อบอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส
- หลอด microcentrifuge
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

10. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดและศึกษาการทำงานของเอนไซม์ 6-phosphofructo-2-kinase และเอนไซม์ fructose 2,6-bisphosphatase

- cuvette
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนชนิดควบคุมอุณหภูมิ
- เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง
- ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่างอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส
- ไมโครปิเปต
- หลอด microcentrifuge
- อลูมินัมฟอยล์

11. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดและศึกษาปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate

- cuvette
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนชนิดควบคุมอุณหภูมิ
- เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง
- ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่างอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส
- ไมโครปิเปต

- หลอด microcentrifuge
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- อลูมิเนียมฟอยล์

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการปลูกข้าว

- สารเคมีสำหรับสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP no.2 (Vajrabhaya และ Vajrabhaya, 1991) (ภาคผนวก ก)
- NaCl (Srichand United Dispensary Co., LTD., Thailand)

2. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดคลอโรฟิลล์

- acetone (Merck, Germany)

3. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดและวัดปริมาณแป้งและน้ำตาล

- 30% potassium hydroxide (Merck, Germany)
- 35% perchoric acid (Merck, Germany)
- 72% sulfuric acid (Merck, Germany)
- 80% ethanol (Liquid Distillery Organization Excise Dept, Thailand)
- anthrone (Sigma-Aldrich Co., USA.)

4. สารเคมีที่ใช้ในการสกัด plasmid DNA

- 3M sodium acetate (Sigma-Aldrich Co., USA.)
- 5X TBE (ภาคผนวก ก)
- 6X DNA loading dye (ภาคผนวก ก)
- absolute ethanol (Liquid Distillery Organization Excise Dept, Thailand)
- agarose (Research Organics, USA)

- DNA marker (1 KB DNA ladder, New England Biolabs, USA)
- ethidium bromide (Gibco BRL, USA)
- LB medium (ภาคผนวก ก)
- phenol: chloroform (1:1)(V/V) (Merck, Germany)
- restriction enzyme (*Pst*I, *Xho*I และ *Bam*HI, New England Biolabs, USA)
- RNase (Sigma-Aldrich Co., USA.)
- solution I (ภาคผนวก ก)
- solution II (ภาคผนวก ก)
- solution III (ภาคผนวก ก)
- TE buffer (ภาคผนวก ก)
- Ultra Clean™ 15 DNA purification Kit (MOBIO Laboratories, Inc, USA)

5. สารเคมีใช้ในการสกัด genomic DNA ข้าว

- 3M sodium acetate (Sigma-Aldrich Co., USA.)
- 5X TBE (ภาคผนวก ก)
- 6X DNA loading dye (ภาคผนวก ก)
- chloroform (Merck, Germany)
- DNA extraction buffer (ภาคผนวก ก)
- DNA marker (1 KB DNA ladder, New England Biolabs, USA)
- ethanol (Liquid Distillery Organization Excise Dept, Thailand)
- ethidium bromide (Gibco BRL, USA)
- liquid nitrogen
- phenol: chloroform (1:1)(V/V) (Merck, Germany)
- Rnase (Sigma-Aldrich Co., USA.)
- TE buffer (ภาคผนวก ก)

6. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Southern blot analysis

- 20X SSC (ภาคผนวก ก)
- 5X TBE (ภาคผนวก ก)
- 6X DNA loading dye (ภาคผนวก ก)
- agarose (Research Organics, USA)
- detection buffer (ภาคผนวก ก)
- Dig high prime DNA labeling and detection starter kit II (Roche Diagnostic GmbH, Roche Applied Science, Germany)
- DNA marker (1 kb DNA ladder, New England Biolabs, USA)
- ethidium bromide (Gibco BRL, USA)
- maleic acid buffer (ภาคผนวก ก)
- restriction enzyme (*EcoRI*, *HindIII* และ *BamHI*, New England Biolabs, USA)
- washing buffer (ภาคผนวก ก)
- สารเคมีที่ใช้ในการล้างฟิล์ม (Kodak (Australia) PTY, LYD., Australia)

7. สารเคมีที่ใช้ในการสกัด RNA ข้าว

- 10M LiCl (Ajex Fine Chem, Australia)
- 5X TBE (ภาคผนวก ก)
- 6X RNA loading dye (ภาคผนวก ก)
- absolute ethanol (Liquid Distillery Organization Excise Dept, Thailand)
- agarose (Research Organics, USA)
- DEPC treated TE buffer (ภาคผนวก ก)
- ethidium bromide (Gibco BRL, USA)
- liquid nitrogen
- phenol: chloroform (1:1)(V/V)(Merck, Germany)
- RNA extraction buffer (ภาคผนวก ก)

8. สารเคมีที่ใช้ในการทำ northern blot analysis
- 10X MOPS (ภาคผนวก ก)
 - 20X SSC (ภาคผนวก ก)
 - 40% formaldehyde (Carlo Erba Reagents, France)
 - agarose (Research Organics, USA)
 - detection buffer (ภาคผนวก ก)
 - DIG high prime DNA labeling and detection starter kit II (Roche Diagnostic GmbH, Roche Applied Science, Germany)
 - ethidium bromide (Gibco BRL, USA)
 - formamide (Carlo Erba Reagents, France)
 - maleic acid buffer (ภาคผนวก ก)
 - RNA loading dye for formaldehyde gel (ภาคผนวก ก)
 - RNA marker (RNA ladder, New England Biolabs, USA)
 - washing buffer (ภาคผนวก ก)
 - สารเคมีที่ใช้ในการล้างฟิล์ม (Kodak (Australia) PTY, LYD., Australia)
9. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดและศึกษาการทำงานของเอนไซม์ 6-phosphofructo-2-kinase และเอนไซม์ fructose 2,6-bisphosphatase
- 3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid -Morpholinepropanesulfonic acid (USB Co, USA)
 - acetone (Merck, Germany)
 - adenosine triphosphate (Sigma-Aldrich Co., USA.)
 - antipain (Sigma-Aldrich Co., USA.)
 - benzamidine (Sigma-Aldrich Co., USA.)
 - EDTA (Bio Basic INC, Canada)
 - ethylene glycol (Sigma-Aldrich Co., USA.)
 - fructose 6-phospahte (Sigma-Aldrich Co., USA.)

- glucose 6-phosphate (Sigma-Aldrich Co., USA.)
- glucose 6-phosphate dehydrogenase (Sigma-Aldrich Co., USA.)
- leupeptine (Sigma-Aldrich Co., USA.)
- liquid nitrogen
- mercaptoethanol (Acros Organics, USA)
- nicotinamide adenine dinucleotidephosphate (Sigma-Aldrich Co., USA.)
- phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma-Aldrich Co., USA.)
- phosphoglucose isomerase (Sigma-Aldrich Co., USA.)
- sephadex G25 (Amersham Pharmacia Biotech limited, Sweden)
- triton X-100 (Sigma-Aldrich Co., USA.)

10. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดและวัดปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate

- acetone (Merck, Germany)
- activated charcoal (Ajax Chemicals, Australia)
- alodolase (Sigma-Aldrich Co., USA.)
- fructose 2,6-bisphosphate (Sigma-Aldrich Co., USA.)
- fructose 6-phosphate (Sigma-Aldrich Co., USA.)
- glycerol-3-phosphate dehydrogenase (Sigma-Aldrich Co., USA.)
- hydrochloric acid (Merck, Germany)
- liquid nitrogen
- nicotinamide adenine dinucleotide (Sigma-Aldrich Co., USA.)
- potassium hydroxide (Merck, Germany)
- pyrophosphate fructose 2,6-bisphosphatase (Sigma-Aldrich Co., USA.)
- tetrasodium pyrophosphate (Sigma-Aldrich Co., USA.)
- triose phosphate isomerase (Sigma-Aldrich Co., USA.)

วิธีการทดลอง

1. การศึกษาผลของภาวะเค็มต่อการเติบโตของข้าวและปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบข้าว

1.1 การศึกษาผลของภาวะเค็มต่อการเติบโตของข้าว

- 1.1.1. เพาะเมล็ดข้าวเหลืองประทิว123 และเมล็ดข้าวเหลืองประทิว123-TC171 ในกระบะทรายเป็นเวลา 1 สัปดาห์
- 1.1.2. ย้ายต้นกล้าที่มีขนาดใกล้เคียงกันปลูกลงในขวดแก้วที่มีสายละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP no.2 (Vajrabhaya และ Vajrabhaya, 1991) จำนวน 25 ต้นต่อขวด เป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยวางในโรงเรือนทดลองที่มีแสงตามธรรมชาติ ตลอดระยะเวลาการทำการทดลองควบคุมระดับของสารละลายธาตุอาหารด้วยการเติมน้ำกรองเพื่อให้สารละลายอยู่ในระดับเดียวกันกับตอนเริ่มต้นการทดลอง
- 1.1.3. วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยมีจำนวนซ้ำ 6 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ต้น และมีชุดการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1	ข้าวเหลืองประทิว123 ในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP no.2
ชุดการทดลองที่ 2	ข้าวเหลืองประทิว123 ในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP no.2 ที่เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 %(W/V)
ชุดการทดลองที่ 3	ข้าวเหลืองประทิว123-TC171 ในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP no.2
ชุดการทดลองที่ 4	ข้าวเหลืองประทิว123-TC171 ในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP no.2 ที่เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5% (W/V)

- 1.1.4. เก็บตัวอย่างข้าวของแต่ละชุดการทดลอง ในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5, 7 และ 9 ภายหลังจากการให้ภาวะเค็มเพื่อบันทึกน้ำหนักสด จากนั้นนำตัวอย่างไปอบในตู้อบตัวอย่างพืชที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาบันทึกน้ำหนักแห้ง

- 1.1.5. นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

1.2. การศึกษาผลของภาวะเค็มต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบข้าว

- 1.2.1. วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยมีชุดการทดลองดังในข้อ 1.1.3 จำนวนซ้ำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 2 ต้น
- 1.2.2. เพาะเมล็ดข้าวเหลืองประทิว 123 และเมล็ดข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 เช่นเดียวกับข้อ 1.1.1-1.1.2
- 1.2.3. เก็บตัวอย่างใบข้าวของแต่ละชุดการทดลองในวันที่ 0, 3 และ 9 ภายหลังจากการให้ภาวะเค็ม โดยห่อตัวอย่างข้าวด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ แล้วแช่ในไนโตรเจนเหลวทันที จากนั้นรักษาตัวอย่างในตู้แช่อุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส
- 1.2.4. วัดปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบข้าวด้วยสารละลาย acetone เข้มข้น 80% (Porra และคณะ, 1989)
- 1.2.5. นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณคลอโรฟิลล์ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

2. การศึกษาผลของภาวะเค็มที่มีต่อปริมาณแป้ง น้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลซูโครสในใบข้าว

2.1. แป้ง

- 2.1.1. วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยมีชุดการทดลองดังข้อ 1.1.3 จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ต้น
- 2.1.2. เพาะเมล็ดข้าวเหลืองประทิว 123 และเมล็ดข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 1.1.1-1.1.2

- 2.1.3. เก็บตัวอย่างใบข้าวของแต่ละชุดการทดลองหลังจากให้ภาวะเค็มในวันที่ 0,1, 2, 3, 5, 7 และ 9 จากนั้นนำตัวอย่างไปอบในตู้อบตัวอย่างพืชที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงนำไปวิเคราะห์ในขั้นต่อไป
- 2.1.4. วัดปริมาณแป้ง ด้วยการทำปฏิกิริยากับสารละลาย anthrone ตามวิธีของ Rose และคณะ (1991)
- 2.1.5. นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณแป้งด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

2.2. น้ำตาลทั้งหมด

- 2.2.1. วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยมีชุดการทดลองดังข้อ 1.1.3 จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ต้น
- 2.2.2. เพาะเมล็ดข้าวเหลืองประทิว 123 และเมล็ดข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 1.1.1-1.1.2
- 2.2.3. เก็บตัวอย่างใบข้าวของแต่ละชุดการทดลองหลังจากให้ภาวะเค็มในวันที่ 0,1, 2, 3, 5, 7 และ 9 จากนั้นนำตัวอย่างไปอบในตู้อบตัวอย่างพืชที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงนำไปวิเคราะห์ในขั้นต่อไป
- 2.2.4. วัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยปฏิกิริยากับสารละลาย anthrone ตามวิธีของ Irigoyen และคณะ (1992)
- 2.2.5. นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

2.3. น้ำตาลซูโครส

- 2.3.1. วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยมีชุดการทดลองดังข้อ 1.1.3 จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ต้น
- 2.3.2. เพาะเมล็ดข้าวเหลืองประทิว123 และเมล็ดข้าวเหลืองประทิว123-TC171 เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 1.1.1-1.1.2
- 2.3.3. เก็บตัวอย่างใบข้าวของแต่ละชุดการทดลองหลังจากให้ภาวะเค็มในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5, 7 และ 9 จากนั้นนำตัวอย่างไปอบในตู้อบตัวอย่างพืชที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงนำไปวิเคราะห์ในขั้นต่อไป
- 2.3.4. วัดปริมาณซูโครสด้วยวิธี cold anthrone ของ Handel (1968)
- 2.3.5. นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลซูโครสด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

3. การศึกษาชีววิทยาระดับโมเลกุลของของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* ในจีโนมข้าว

3.1 การศึกษายีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* ในจีโนมข้าว

- 3.1.1. เพาะเมล็ดข้าวเหลืองประทิว123 และเมล็ดข้าวเหลืองประทิว123-TC171 เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 1.1.1-1.1.2
- 3.1.2. เก็บตัวอย่างใบข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ โดยห่อตัวอย่างข้าวด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ แล้วแช่ในไนโตรเจนเหลวทันที จากนั้นรักษาตัวอย่างในตู้แช่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส
- 3.1.3. สกัด genomic DNA จากใบข้าวด้วยวิธี modified CTAB (Thikart และคณะ, 2005)

3.1.4. ศึกษา ยีน *6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* ด้วยวิธี Southern blot analysis (Sambrook และคณะ, 1989) ใช้ชิ้นส่วนของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* (OsD1B15-5) ขนาด 152 เบส (สมพร มณีประสพสุข, 2547) เป็นต้นแบบในปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* จากนั้นทำให้ชิ้นส่วน DNA ที่ได้ ให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วย Ultra Clean™ 15 DNA Purification Kit (MOBIO laboratories Inc, USA) ตีฉลากและตรวจทดสอบตามคู่มือของ Enhanced Chemiluminescence (ECL) labeling and detection system (Amersham, Sweden)

3.2 การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *6-phosphofructo-2kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* หลังจากได้รับภาวะเค็ม

3.2.1. เพาะเมล็ดข้าวเหลืองประทิว 123 และเมล็ดข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 1.1.1-1.1.2

3.2.2. เก็บตัวอย่างใบข้าวของแต่ละชุดการทดลองหลังได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 0, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยห่อตัวอย่างข้าวด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ แล้วแช่ในไนโตรเจนเหลวทันที จากนั้นรักษาตัวอย่างในตู้แช่อุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส

3.2.3. สกัด RNA จากใบข้าวตามวิธี hot phenol (Thikart และคณะ, 2005) (ภาคผนวก ข)

3.2.4. ใช้ ปริมาณ RNA 40 ไมโครกรัม เพื่อตรวจทดสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี northern blot analysis (Sambrook และคณะ, 1989) ใช้การแยกด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 4 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 150 นาที และใช้ full-length cDNA ของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* (J023003N10, RIKEN institute, Japan) เป็นตัวติดตาม ซึ่งเตรียมโดยใช้วิธี small-scale preparation of plasmid, lysis by alkaline (Sambrook และคณะ, 1989) จากนั้นตัด plasmid DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I เพื่อแยกชิ้นส่วนยีน ขนาด 3 kb แล้ว

ทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วย Ultra Clean™ 15 DNA Purification Kit (MOBIO laboratories Inc, USA) ตีคนลากและตรวจสอบการแสดงผลออกตามคู่มือของ Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche Diagnostic GmbH, Roche Applied Science, Germany)

4. ผลของภาวะเค็มต่อกิจกรรมของเอนไซม์ 6-phosphofructo-2-kinase เอนไซม์ fructose 2,6-bisphosphatase และปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate

4.1 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ 6-phosphofructo-2-kinase และเอนไซม์ fructose 2,6-bisphosphatase

- 4.1.1 วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยมีชุดการทดลองดังข้อ 1.1.3 จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ต้น
- 4.1.2 เพาะเมล็ดข้าวเหลืองประทิว 123 และเมล็ดข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 1.1.1-1.1.2
- 4.1.3 เก็บตัวอย่างใบข้าวของแต่ละชุดการทดลอง 3 ช่วงเวลา คือหลังการให้ภาวะเค็มเป็นเวลา 0, 3 และ 9 วัน ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณแป้งและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดอย่างชัดเจน โดยห่อตัวอย่างข้าวด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ แล้วแช่ในไนโตรเจนเหลวทันที จากนั้นรักษาตัวอย่างในตู้แช่อุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส
- 4.1.4 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 6-phosphofructo-2-kinase จากปฏิกิริยาในหลอดทดลอง เพื่อวัดการเกิด fructose 2,6-bisphosphate (Neilsen, 1992) (ภาคผนวก ข)
- 4.1.5 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ fructose 2,6-bisphosphatase จากปฏิกิริยาในหลอดทดลอง เพื่อวัดการลดลงของ fructose 2,6-bisphosphate (Neilsen, 1992) (ภาคผนวก ข)
- 4.1.6 หาปริมาณคลอโรฟิลล์ในสารสกัดด้วย 80% acetone (V/V) ตามวิธีของ Porra และคณะ (1989)

- 4.1.7 นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย กิจกรรมของเอนไซม์ 6-phosphofructo-2-kinase และเอนไซม์ fructose 2,6-bisphosphatase ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

4.2 ศึกษาปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate ภายหลังได้รับภาวะเค็ม

- 4.2.1 วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยมีชุดการทดลองดังข้อ 1.1.3 จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 2 ต้น
- 4.2.2 เพาะเมล็ดข้าวเหลืองประทิว123 และเมล็ดข้าวเหลืองประทิว123-TC171 เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 1.1.1-1.1.2
- 4.2.3 เก็บตัวอย่างใบข้าวของแต่ละชุดการทดลอง 3 ช่วงเวลา คือหลังการให้ภาวะเค็มเป็นเวลา 0,3 และ 9 วัน โดยห่อตัวอย่างข้าวด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ แล้วแช่ในไนโตรเจนเหลวทันที จากนั้นรักษาตัวอย่างในตู้แช่อุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส
- 4.2.4 วิเคราะห์ปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate โดยอาศัยความสามารถการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ pyrophosphate fructose 6-phosphate phosphotransferase ตามวิธีของ Trevanion (2000) (ภาคผนวก ข)
- 4.2.5 สร้างกราฟมาตรฐานเพื่อวัดปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate โดยแบ่งสารสกัด 100 ไมโครลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อเป็นการทำลาย fructose 2,6-phosphate ในสารสกัดเป็นเวลา 10 นาทีแล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย โฟแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติม fructose 2,6-bisphosphate 0 0.25 และ 0.5 พีโคโมลลงไป วัดอัตราการทำงานของเอนไซม์ fructose 6-phosphate phosphotransferase สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างอัตราการทำงานและปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate จากนั้นนำสมการของความสัมพันธ์ดังกล่าวมาคำนวณปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate ในเนื้อเยื่อ

- 4.2.6 หาปริมาณคลอโรฟิลล์ในสารสกัด ด้วย 80% acetone (V/V) ตามวิธีของ Porra และคณะ (1989)
- 4.2.7 นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การศึกษาผลของภาวะเค็มต่อการเติบโตของข้าวและปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบข้าว

1.1. การศึกษาผลของภาวะเค็มต่อการเติบโตของข้าว

1.1.1 น้ำหนักสด

เมื่อปลูกเลี้ยงในภาวะปกติในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP no.2 (Vajrabhaya และ Vajrabhaya, 1991) น้ำหนักสดของข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์มีค่าใกล้เคียงกัน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1, รูปที่ 1) แต่ภายหลังจากทดลองให้ภาวะเค็มด้วยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5% เป็นเวลา 2 วัน ต้นกล้าของข้าวเหลืองประทิว 123 เริ่มมีน้ำหนักสดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับต้นกล้าของข้าวสายพันธุ์เดียวกันที่ปลูกในภาวะปกติ ในวันที่ 9 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลอง ภาวะเค็มส่งผลให้ต้นกล้าข้าวเหลืองประทิว 123 สูญเสียน้ำหนักสดไป 28.96% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ตารางที่ 1, รูปที่ 1)

ในข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 เริ่มมีน้ำหนักสดที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ภายหลังจากให้สารละลายธาตุอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5% เป็นเวลา 2 วัน อย่างไรก็ตาม โดยภาพรวมต้นกล้าของข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 สามารถรักษาน้ำหนักสดได้ดีกว่าในข้าวเหลืองประทิว 123 โดยในวันสุดท้ายของการทดลอง ต้นข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 สูญเสียน้ำหนักสดไปเพียง 15.63% เมื่อเปรียบเทียบกับต้นข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 ที่ปลูกเลี้ยงอยู่ในภาวะปกติ (ตารางที่ 1, รูปที่ 1)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.1.2 น้ำหนักแห้ง

ต้นข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ที่ปลูกเลี้ยงในสภาพปกติ มีน้ำหนักแห้งที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาทำการทดลอง อย่างใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 2, รูปที่ 2) ความเค็มส่งผลกระทบต่อความสามารถในการเพิ่มน้ำหนักแห้งของต้นข้าวเหลืองประทิว 123 มากกว่าในข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 สังเกตได้จากต้นกล้าข้าวเหลืองประทิว 123 ที่ปลูกในภาวะเค็ม มีน้ำหนักแห้งต่ำกว่าข้าวสายพันธุ์เดียวกันที่ปลูกในภาวะปกติ ภายหลังจากให้ภาวะเค็มเป็นเวลา 7 วัน ข้าวเหลืองประทิว 123 ที่ปลูกในภาวะเค็มมีน้ำหนักแห้งต่ำกว่าถึง 8.02% เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวสายพันธุ์เดียวกันที่เลี้ยงในภาวะปกติ เมื่ออยู่ในภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วัน ข้าวเหลืองประทิว 123 มีมวลรวมลดลงถึง 13.34% ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำกว่าชุดการทดลองควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2, รูปที่ 2) ข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 ที่ทำการทดลองภายใต้ภาวะเค็ม มีน้ำหนักแห้งใกล้เคียงกับชุดการทดลองที่เลี้ยงในภาวะปกติ และเมื่อทดสอบด้วยสถิติพบว่าการให้ภาวะเค็มด้วยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5% เป็นเวลา 9 วัน ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักแห้งในข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 (ตารางที่ 2, รูปที่ 2)

เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของต้นกล้าข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ ในชุดการทดลองที่ได้รับระดับของภาวะเค็ม 0.5% ของโซเดียมคลอไรด์เป็นเวลาตั้งแต่ 7 วันขึ้นไป เห็นได้ชัดว่าข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 สามารถมีการเติบโตได้ดีกว่าข้าวเหลืองประทิว 123 (ตารางที่ 2, รูปที่ 2)

1.2. การศึกษาผลของภาวะเค็มต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบข้าว

ตลอดระยะเวลา 9 วันของระยะเวลาการทดลองการให้สภาวะเค็มด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5% ในต้นข้าวเหลืองประทิว 123 และข้าวสายพันธุ์ทนเค็มเหลืองประทิว 123-TC171 เกิดลักษณะอาการใบแห้ง ปลายใบไหม้ และเกิด chlorosis เป็นหย่อมๆ แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณคลอโรฟิลล์ในทุกชุดการทดลอง ตลอดการทดลอง พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์ของทุกชุดการทดลองมีค่าใกล้เคียง ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 3, รูปที่ 3)

ตารางที่ 1 น้ำหนักสดของข้าวเหลืองประทิว 123 และเหลืองประทิว 123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 % (W/V) เป็นเวลา 9 วัน (mean \pm standard error)

ระยะเวลา(วัน)	น้ำหนักสด (มิลลิกรัม) \pm standard error			
	เหลืองประทิว 123		เหลืองประทิว 123-TC171	
	0%NaCl	0.5%NaCl	0%NaCl	0.5%NaCl
0	112.62 \pm 1.54 ^{aC}	114.05 \pm 3.61 ^{aA}	122.74 \pm 1.36 ^{aBCD}	117.64 \pm 3.13 ^{aAB}
1	113.17 \pm 2.11 ^{aC}	114.37 \pm 2.49 ^{aA}	114.93 \pm 4.43 ^{aD}	119.60 \pm 3.84 ^{aAB}
2	115.47 \pm 4.03 ^{aC}	104.75 \pm 3.54 ^{bAB}	119.32 \pm 1.15 ^{aCD}	104.90 \pm 2.16 ^{bC}
3	120.51 \pm 1.47 ^{abBC}	104.54 \pm 3.09 ^{cAB}	126.54 \pm 3.17 ^{aBC}	116.58 \pm 3.81 ^{bAB}
5	127.54 \pm 2.98 ^{bAB}	111.81 \pm 3.46 ^{cA}	139.31 \pm 2.30 ^{aA}	122.17 \pm 4.58 ^{bcA}
7	132.51 \pm 3.54 ^{aA}	100.55 \pm 3.69 ^{cBC}	131.18 \pm 4.29 ^{aAB}	111.11 \pm 2.15 ^{bBC}
9	130.73 \pm 6.81 ^{aAB}	92.87 \pm 2.82 ^{cC}	138.09 \pm 3.19 ^{aA}	116.51 \pm 2.92 ^{bAB}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)
 ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 2 น้ำหนักแห้งของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 %(W/V) เป็นเวลา 9 วัน (mean \pm standard error)

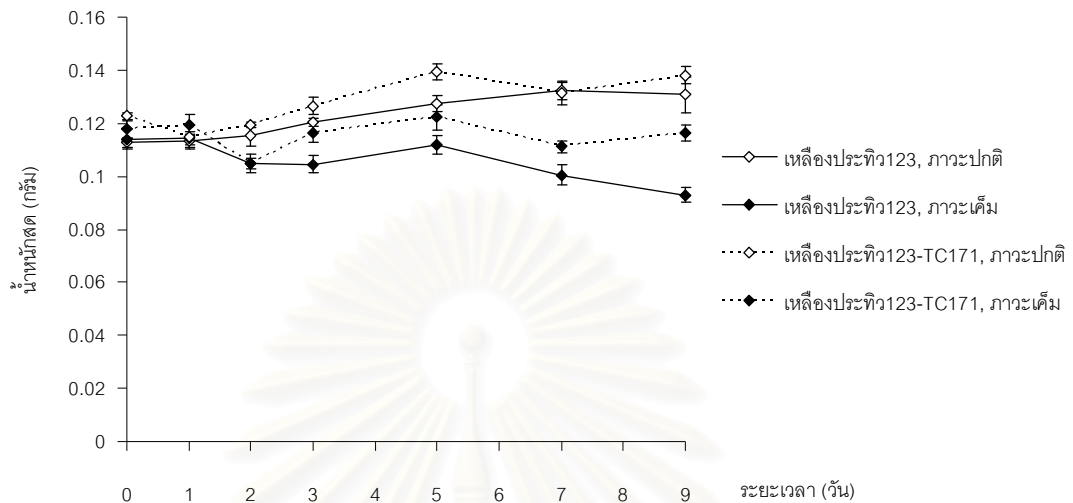
ระยะเวลา(วัน)	น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม) \pm standard error			
	เหลืองประทิว123		เหลืองประทิว123-TC171	
	0%NaCl	0.5%NaCl	0%NaCl	0.5%NaCl
0	13.20 \pm 0.19 ^{aD}	13.50 \pm 0.18 ^{aD}	13.31 \pm 0.26 ^{aBC}	13.50 \pm 0.30 ^{aC}
1	13.32 \pm 0.18 ^{abCD}	14.06 \pm 0.22 ^{aCD}	12.41 \pm 0.51 ^{bC}	12.85 \pm 0.31 ^{bC}
2	14.85 \pm 0.45 ^{aC}	13.92 \pm 0.45 ^{abCD}	13.65 \pm 0.36 ^{abBC}	13.26 \pm 0.47 ^{bC}
3	14.51 \pm 0.24 ^{aCD}	14.81 \pm 0.40 ^{aBC}	14.50 \pm 0.39 ^{aB}	15.36 \pm 0.47 ^{aB}
5	16.52 \pm 0.58 ^{aB}	16.78 \pm 0.36 ^{aA}	15.87 \pm 0.52 ^{aA}	15.83 \pm 0.37 ^{aB}
7	17.31 \pm 0.49 ^{aAB}	15.33 \pm 0.47 ^{bB}	15.92 \pm 0.60 ^{abA}	16.28 \pm 0.64 ^{abB}
9	18.09 \pm 1.13 ^{aA}	15.68 \pm 0.23 ^{bB}	17.13 \pm 0.33 ^{abA}	17.66 \pm 0.61 ^{abA}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)
 ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)

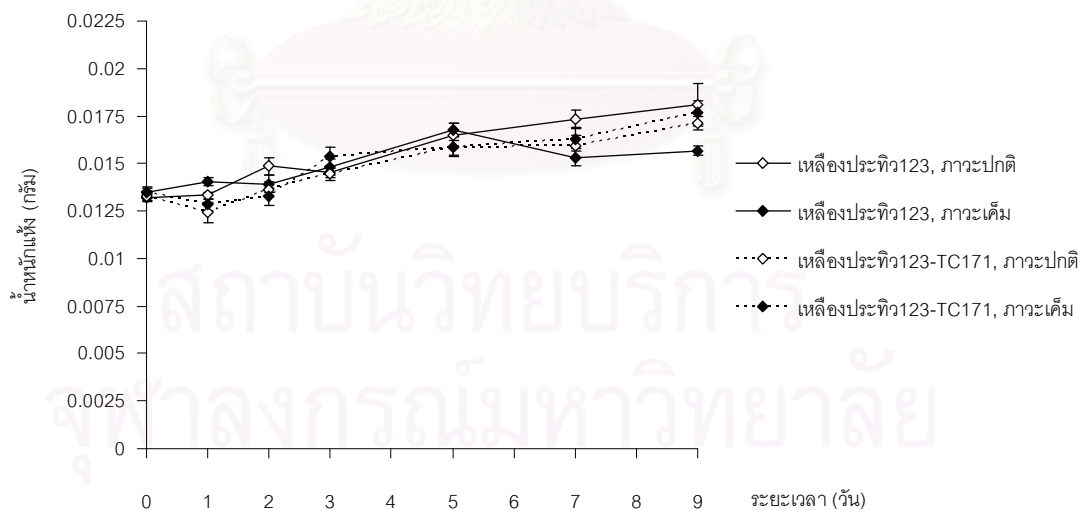
ตารางที่ 3 ปริมาณคลอโรฟิลล์ของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 %(W/V) เป็นเวลา 9 วัน (mean \pm standard error)

ระยะเวลา(วัน)	คลอโรฟิลล์ (mg g ⁻¹ fresh wt) \pm standard error			
	เหลืองประทิว123		เหลืองประทิว123-TC171	
	0%NaCl	0.5%NaCl	0%NaCl	0.5%NaCl
0	0.26 \pm 0.03 ^{aA}	0.26 \pm 0.01 ^{aB}	0.33 \pm 0.03 ^{aB}	0.35 \pm 0.05 ^{aA}
3	0.36 \pm 0.05 ^{aA}	0.47 \pm 0.05 ^{aA}	0.49 \pm 0.06 ^{aA}	0.52 \pm 0.13 ^{aA}
9	0.37 \pm 0.03 ^{aA}	0.35 \pm 0.08 ^{aAB}	0.28 \pm 0.04 ^{aB}	0.41 \pm 0.03 ^{aA}

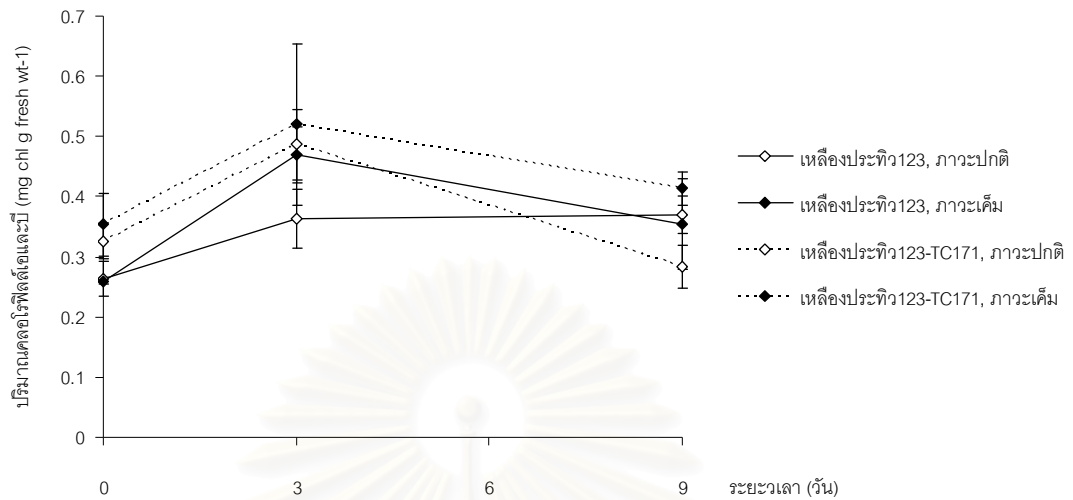
* ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.05$)
 ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.05$)



รูปที่ 1 น้ำหนักสดของต้นข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5% (W/V) เป็นเวลา 9 วัน (mean \pm standard error)



รูปที่ 2 น้ำหนักแห้งของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 % (W/V) เป็นเวลา 9 วัน (mean \pm standard error)



รูปที่ 3 ปริมาณคลอโรฟิลล์ของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีไซโตไคนมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 % (W/V) เป็นเวลา 9 วัน (mean \pm standard error)

2. การศึกษาผลของภาวะเค็มที่มีต่อปริมาณแป้ง น้ำตาลทั้งหมด และน้ำตาลซูโครสในใบข้าว

2.1 แป้ง

ข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ชุดการทดลองที่ปลูกเลี้ยงในภาวะปกติ มีปริมาณแป้งที่สะสมในใบใกล้เคียงกันไม่พบค่าความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4, รูปที่ 4) ข้าวเหลืองประทิว 123 ชุดการทดลองที่เลี้ยงในภาวะเค็มเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้งใกล้เคียงกับชุดการทดลองควบคุม แต่เมื่อเข้าสู่วันที่ 9 ของการทดลอง ข้าวของชุดที่เลี้ยงในภาวะเค็มมีปริมาณแป้งในใบน้อยกว่าข้าวสายพันธุ์เดียวกันที่เลี้ยงในภาวะปกติ ถึง 44.84% ซึ่งต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4, รูปที่ 4)

ภาวะเค็มส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแป้งในข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 ได้ชัดเจนกว่า โดยข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 มีแนวโน้มของปริมาณแป้งในใบลดต่ำกว่าในข้าวสายพันธุ์เดียวกันที่ปลูกในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ภายหลังจากการให้ภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วัน ปริมาณแป้งในใบข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 ต่ำกว่าชุดการทดลองควบคุมถึง 60.01% (ตารางที่ 4, รูปที่ 4)

2.2 น้ำตาลทั้งหมด

การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดภายหลังการให้ภาวะเค็มในข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ มีแนวโน้มไปในทิศทางที่เพิ่มสูงขึ้นหลังจากการให้ภาวะเค็ม เมื่อเข้าสู่วันที่ 3 ของการให้ภาวะเค็ม ทั้งข้าวเหลืองประทิว 123 และข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 ในชุดทดลองที่ให้ภาวะเค็มมีปริมาณน้ำตาลในใบสูงกว่าต้นกล้าพันธุ์เดียวกันที่ปลูกเลี้ยงในสภาพปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยน้ำตาลที่สะสมในใบเพิ่มขึ้น 132.28 และ 195.91% ตามลำดับ (ตารางที่ 5, รูปที่ 5) จากนั้นปริมาณน้ำตาลในต้นข้าวที่ปลูกเลี้ยงในภาวะเค็ม ยังคงมีการสะสมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาของการทดลอง โดยในวันที่ 9 ของการทดลองให้ภาวะเค็ม พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในต้นข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 เพิ่มขึ้นสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวสายพันธุ์เดียวกันซึ่งเป็นชุดการทดลองควบคุม และสูงกว่าในข้าวเหลืองประทิว 123 ทั้งชุดที่เลี้ยงในภาวะปกติและภาวะเค็ม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5, รูปที่ 5)

2.3 น้ำตาลซูโครส

การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลซูโครสภายหลังการให้ภาวะเค็มในข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ เพิ่มขึ้นหลังจากการให้ภาวะเค็ม ในต้นข้าวเหลืองประทิว123-TC171 มีการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลซูโครสที่ชัดเจนในวันที่ 3 หลังการให้สารละลายธาตุอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5% (W/V) โดยมีปริมาณน้ำตาลซูโครสเฉลี่ย $43.94 \mu\text{mole g}^{-1} \text{ dry wt}$ เพิ่มสูงกว่าในชุดควบคุมที่เป็นสายพันธุ์เดียวกันและสูงกว่าในชุดการทดลองของข้าวเหลืองประทิว123 ที่อยู่ภายใต้ภาวะเค็มอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 10, รูปที่ 12) ในเวลาต่อมาต้นข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ที่ปลูกในสภาวะเค็มมีแนวโน้มที่จะสะสมน้ำตาลซูโครสเพิ่มขึ้น ตามระยะเวลาของการทำการทดลอง และเมื่อทดสอบด้วยสถิติจะเห็นได้ชัดว่าข้าวเหลืองประทิว123-TC171 มีความสามารถในการสะสมน้ำตาลซูโครสภายใต้สภาวะเค็มได้มากกว่าข้าวเหลืองประทิว 123 ตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดลองเรื่อยมาจนกระทั่งวันที่ 9 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลอง (ตารางที่ 6, รูปที่ 6)

เมื่อพิจารณาน้ำตาลที่ไม่ใช่ซูโครส (non-sucrose sugar) โดยการนำปริมาณน้ำตาลซูโครส ลบออกจากค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมด พบว่าในทุกชุดการทดลองมีปริมาณน้ำตาลที่ไม่ใช่ซูโครสใกล้เคียงกันซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 7, รูปที่ 7)

2.4 อัตราส่วนระหว่างแป้งและน้ำตาลซูโครส

การทดลองให้ภาวะเค็มแก่ข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ ส่งผลให้อัตราส่วนระหว่างแป้งระหว่างน้ำตาลซูโครส มีการเปลี่ยนแปลง โดยอัตราส่วนระหว่างแป้งและน้ำตาลซูโครสในใบข้าวเริ่มมีการตอบสนองต่ออย่างชัดเจน ภายหลังการให้ภาวะเค็มเป็นเวลา 5 วัน

ในวันที่ 7 และ 9 ของการทดลองให้ภาวะเค็ม พบว่าภาวะเค็มส่งผลให้อัตราส่วนของแป้งและน้ำตาลซูโครสข้าวเหลืองประทิว123-TC171 เพิ่มขึ้นอย่างมาก เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวสายพันธุ์เดียวกันซึ่งเป็นชุดการทดลองควบคุม และสูงกว่าในข้าวเหลืองประทิว 123 ทั้งชุดทดลองที่ให้ภาวะเค็มและชุดควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 8, รูปที่ 8)

ตารางที่ 4 ปริมาณแป้งในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 %(W/V) เป็นเวลา 9 วัน (mean \pm standard error)

ระยะเวลา(วัน)	แป้ง ($\mu\text{mole glucose g}^{-1}$ dry wt)** \pm standard error			
	เหลืองประทิว123		เหลืองประทิว123-TC171	
	0%NaCl	0.5%NaCl	0%NaCl	0.5%NaCl
0	39.46 \pm 1.40 ^{aABC}	42.35 \pm 3.86 ^{aA}	41.32 \pm 2.58 ^{aAB}	41.32 \pm 5.83 ^{aA}
1	53.01 \pm 2.57 ^{aA}	50.79 \pm 1.49 ^{aA}	48.50 \pm 1.81 ^{aA}	50.86 \pm 1.31 ^{aA}
2	42.25 \pm 6.01 ^{aABC}	44.69 \pm 2.29 ^{aA}	38.29 \pm 1.92 ^{aAB}	38.32 \pm 8.23 ^{aA}
3	47.23 \pm 4.08 ^{aAB}	47.54 \pm 4.03 ^{aA}	49.26 \pm 3.29 ^{aA}	45.86 \pm 4.71 ^{aA}
5	38.02 \pm 7.28 ^{aABC}	33.66 \pm 1.18 ^{aB}	32.96 \pm 7.29 ^{aB}	21.21 \pm 1.34 ^{aB}
7	30.26 \pm 1.20 ^{aC}	29.15 \pm 3.10 ^{aBC}	32.50 \pm 4.62 ^{aB}	16.62 \pm 1.66 ^{bB}
9	35.15 \pm 7.17 ^{abBC}	23.99 \pm 2.38 ^{bcC}	37.54 \pm 2.23 ^{aAB}	16.53 \pm 0.54 ^{cB}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ที่เหมือนกันตามแนวดิ่ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)

** การวัดปริมาณแป้ง เทียบกับ μmole ของกลูโคส

ตารางที่ 5 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 % (W/V) เป็นเวลา 9 วัน (mean \pm standard error)

ระยะเวลา(วัน)	น้ำตาลทั้งหมด ($\mu\text{mole glucose g}^{-1}$ dry wt)** \pm standard error			
	เหลืองประทิว123		เหลืองประทิว123-TC171	
	0%NaCl	0.5%NaCl	0%NaCl	0.5%NaCl
0	51.25 \pm 1.42 ^{aDE}	53.60 \pm 0.40 ^{aDE}	60.49 \pm 3.44 ^{aABCD}	56.47 \pm 6.65 ^{aD}
1	45.22 \pm 2.48 ^{aE}	45.06 \pm 0.72 ^{aE}	44.16 \pm 3.37 ^{aD}	49.41 \pm 3.36 ^{aD}
2	60.08 \pm 1.86 ^{abCD}	64.03 \pm 5.70 ^{aCD}	51.83 \pm 1.43 ^{bBCD}	59.67 \pm 0.69 ^{abD}
3	56.26 \pm 4.89 ^{bD}	74.39 \pm 7.34 ^{aBC}	47.92 \pm 3.63 ^{bCD}	93.87 \pm 5.55 ^{aBC}
5	67.64 \pm 1.63 ^{abBC}	78.74 \pm 1.93 ^{aAB}	61.64 \pm 9.38 ^{bABC}	89.86 \pm 0.75 ^{aC}
7	74.81 \pm 1.81 ^{abAB}	84.56 \pm 0.39 ^{aAB}	66.65 \pm 5.51 ^{bAB}	112.16 \pm 8.35 ^{aA}
9	77.05 \pm 3.89 ^{bA}	87.74 \pm 3.90 ^{bA}	74.14 \pm 4.42 ^{bA}	107.66 \pm 6.36 ^{aAB}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ที่เหมือนกันตามแนวดิ่ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)

** การวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เทียบกับ μmole ของกลูโคส

ตารางที่ 6 ปริมาณน้ำตาลซูโครสในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 % (W/V) เป็นเวลา 9 วัน (mean \pm standard error)

ระยะเวลา(วัน)	น้ำตาลซูโครส($\mu\text{mole g}^{-1}$ dry wt) \pm standard error			
	เหลืองประทิว123		เหลืองประทิว123-TC171	
	0%NaCl	0.5%NaCl	0%NaCl	0.5%NaCl
0	17.00 \pm 2.07 ^{aC}	14.69 \pm 0.62 ^{aC}	17.51 \pm 2.09 ^{aB}	14.92 \pm 1.42 ^{aE}
1	13.75 \pm 0.05 ^{bC}	18.23 \pm 0.47 ^{aC}	18.65 \pm 1.62 ^{aB}	17.09 \pm 0.28 ^{aE}
2	39.81 \pm 4.64 ^{aA}	34.32 \pm 5.65 ^{aB}	28.78 \pm 4.25 ^{aA}	32.40 \pm 4.92 ^{aD}
3	18.13 \pm 0.67 ^{cC}	36.74 \pm 2.83 ^{bB}	14.95 \pm 2.38 ^{cB}	43.94 \pm 0.40 ^{aC}
5	28.73 \pm 4.99 ^{bB}	48.84 \pm 0.69 ^{aA}	22.09 \pm 0.60 ^{bB}	46.47 \pm 1.56 ^{aBC}
7	29.35 \pm 1.18 ^{cB}	33.73 \pm 2.31 ^{bB}	20.34 \pm 0.20 ^{dB}	60.18 \pm 0.50 ^{aA}
9	31.64 \pm 1.28 ^{cAB}	36.66 \pm 0.84 ^{bB}	19.54 \pm 1.41 ^{dB}	50.88 \pm 1.40 ^{aB}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)
 ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ที่เหมือนกันตามแนวดิ่ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 7 ปริมาณน้ำตาลที่เป็น non-sucrose sugar ในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 %(W/V) เป็นเวลา 9 วัน (mean \pm standard error)

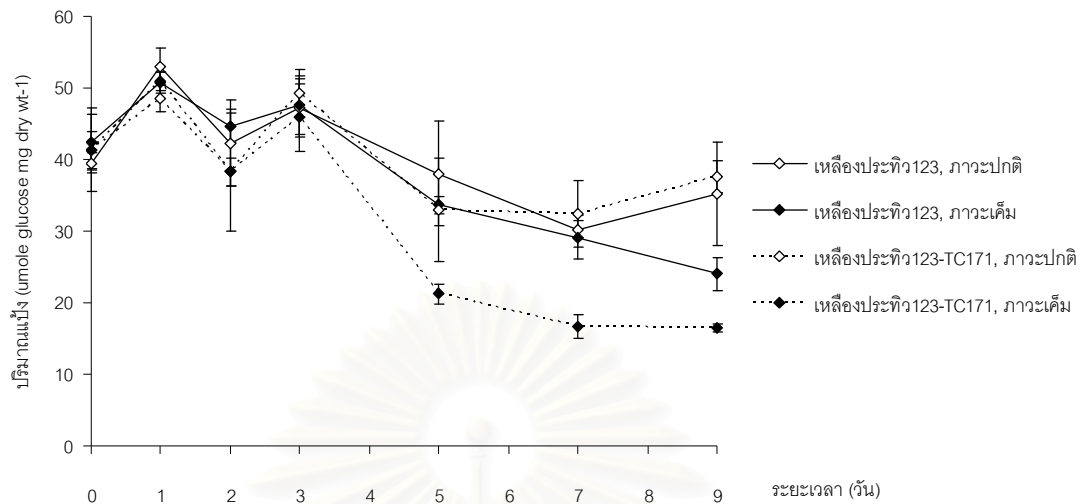
ระยะเวลา(วัน)	Non-sucrose sugar ($\mu\text{mole g}^{-1}$ dry wt) \pm standard error			
	เหลืองประทิว123		เหลืองประทิว123-TC171	
	0%NaCl	0.5%NaCl	0%NaCl	0.5%NaCl
0	34.25 \pm 2.94 ^{aAB}	38.92 \pm 0.52 ^{aB}	42.98 \pm 2.13 ^{aAB}	41.55 \pm 5.59 ^{aABC}
1	31.47 \pm 2.51 ^{aBC}	26.82 \pm 0.82 ^{aB}	25.51 \pm 2.53 ^{aCD}	32.32 \pm 3.10 ^{aBC}
2	20.28 \pm 3.69 ^{aC}	29.71 \pm 5.25 ^{aB}	23.05 \pm 5.63 ^{aD}	27.27 \pm 5.61 ^{aAC}
3	38.13 \pm 4.80 ^{aAB}	37.65 \pm 6.86 ^{aB}	32.97 \pm 1.45 ^{aABCD}	49.94 \pm 5.92 ^{aB}
5	38.91 \pm 6.37 ^{aAB}	29.89 \pm 2.14 ^{aB}	39.55 \pm 8.79 ^{aABC}	43.39 \pm 2.11 ^{aABC}
7	45.46 \pm 1.28 ^{aA}	50.83 \pm 2.64 ^{aA}	46.31 \pm 5.71 ^{aAB}	51.98 \pm 8.33 ^{aA}
9	45.41 \pm 4.98 ^{aA}	51.09 \pm 3.76 ^{aA}	54.60 \pm 3.04 ^{aA}	56.78 \pm 5.06 ^{aA}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)
 ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)

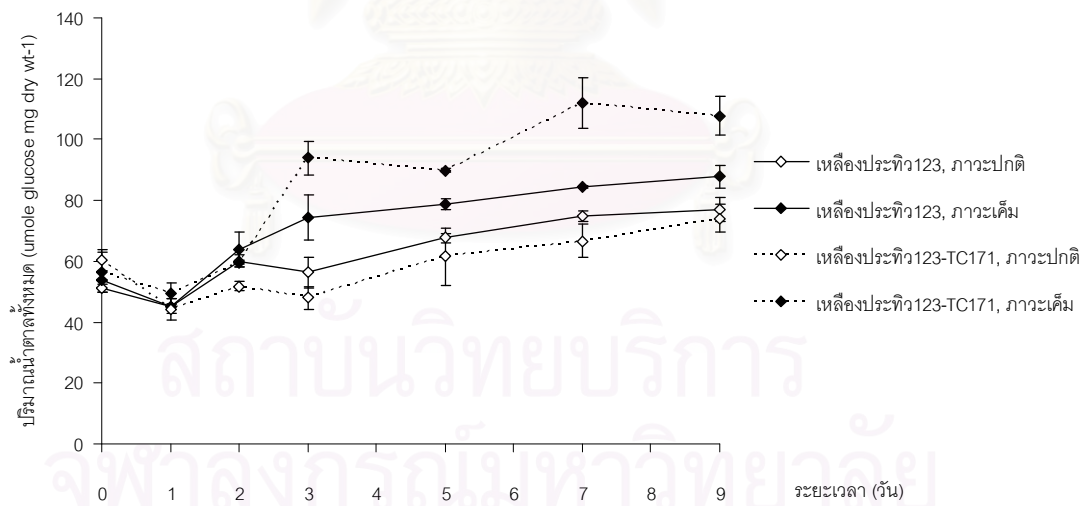
ตารางที่ 8 อัตราส่วนระหว่างน้ำตาลซูโครสและแป้งของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหาร สูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 %(W/V) เป็นเวลา 9 วัน (mean \pm standard error)

ระยะเวลา(วัน)	อัตราส่วนระหว่างน้ำตาลซูโครสและแป้ง \pm standard error			
	เหลืองประทิว123		เหลืองประทิว123-TC171	
	0%NaCl	0.5%NaCl	0%NaCl	0.5%NaCl
0	0.44 \pm 0.07 ^{aB}	0.35 \pm 0.03 ^{aD}	0.42 \pm 0.03 ^{aBC}	0.37 \pm 0.03 ^{aE}
1	0.26 \pm 0.01 ^{bB}	0.36 \pm 0.02 ^{aD}	0.38 \pm 0.02 ^{aBC}	0.34 \pm 0.00 ^{aE}
2	0.96 \pm 0.12 ^{aA}	0.77 \pm 0.12 ^{aC}	0.75 \pm 0.10 ^{aA}	0.90 \pm 0.20 ^{aDE}
3	0.39 \pm 0.02 ^{bB}	0.78 \pm 0.06 ^{aC}	0.31 \pm 0.06 ^{bC}	0.98 \pm 0.12 ^{aD}
5	0.77 \pm 0.07 ^{cA}	1.45 \pm 0.03 ^{bAB}	0.74 \pm 0.16 ^{cA}	2.21 \pm 0.15 ^{aC}
7	0.97 \pm 0.03 ^{bA}	1.17 \pm 0.09 ^{bB}	0.65 \pm 0.10 ^{bAB}	3.69 \pm 0.34 ^{aA}
9	0.96 \pm 0.15 ^{cA}	1.56 \pm 0.18 ^{bA}	0.53 \pm 0.07 ^{cABC}	3.09 \pm 0.19 ^{aB}

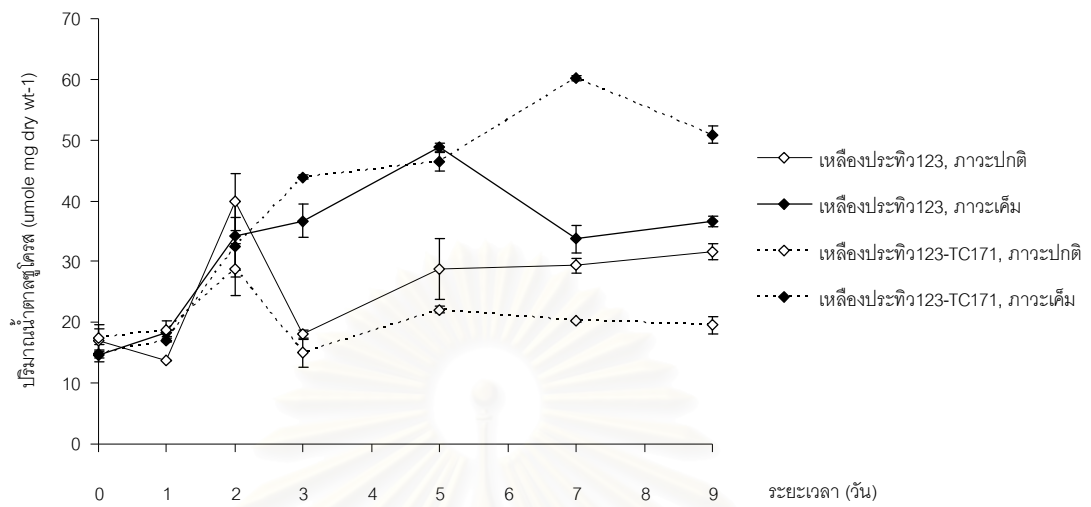
* ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)
 ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ที่เหมือนกันตามแนวดิ่ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)



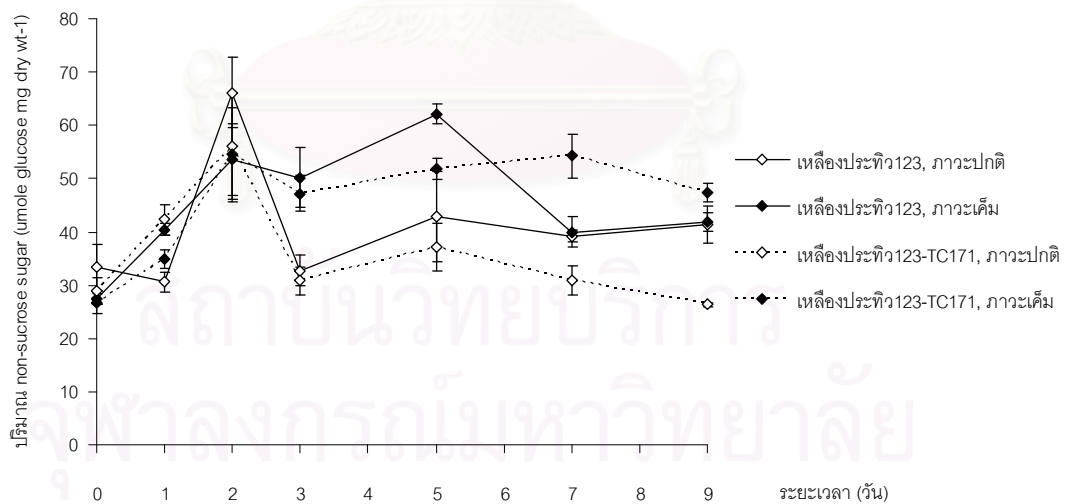
รูปที่ 4 ปริมาณแป้งในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5%(W/V) เป็นเวลา 9 วัน (mean \pm standard error)



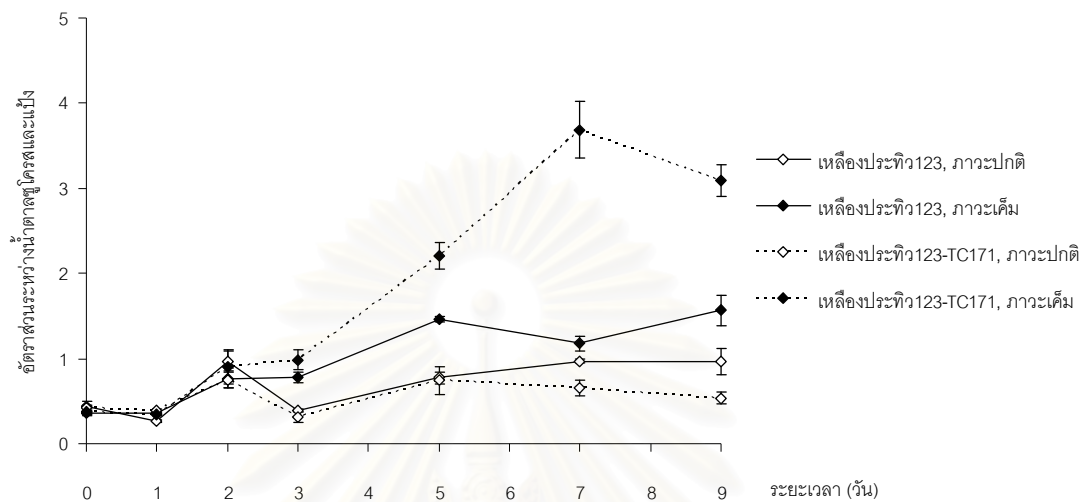
รูปที่ 5 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5%(W/V) เป็นเวลา 9 วัน (mean \pm standard error)



รูปที่ 6 ปริมาณน้ำตาลซูโครสในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีไซเตียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 %(W/V) เป็นเวลา 9 วัน (mean \pm standard error)



รูปที่ 7 ปริมาณน้ำตาลที่เป็น non-sucrose sugar ในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีไซเตียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 %(W/V) เป็นเวลา 9 วัน (mean \pm standard error)



รูปที่ 8 อัตราส่วนระหว่างน้ำตาลซูโครสและแป้งของข้าวเหลืงประทิว123 และเหลืงประทิว 123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 % (W/V) เป็นเวลา 9 วัน (mean \pm standard error)

3. การศึกษาชีววิทยาระดับโมเลกุลของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase*

3.1 การศึกษา organization ของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* ในจีโนมของข้าว

การศึกษายีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* ในจีโนมของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 ด้วยวิธี Southern blot analysis โดยตัด genomic DNA ของข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*, *BamHI* และ *HindIII* และใช้โคลน Os_D1B15_5 (สมพร มณีประสพสุข, 2547) ซึ่งมีลำดับของนิวคลีโอไทด์ตั้งแสดงในภาคผนวก ง เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ โดยใช้ปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) แล้วทำการติดฉลากโดยใช้ ECL labeling and detection system (Amersham, Sweden)

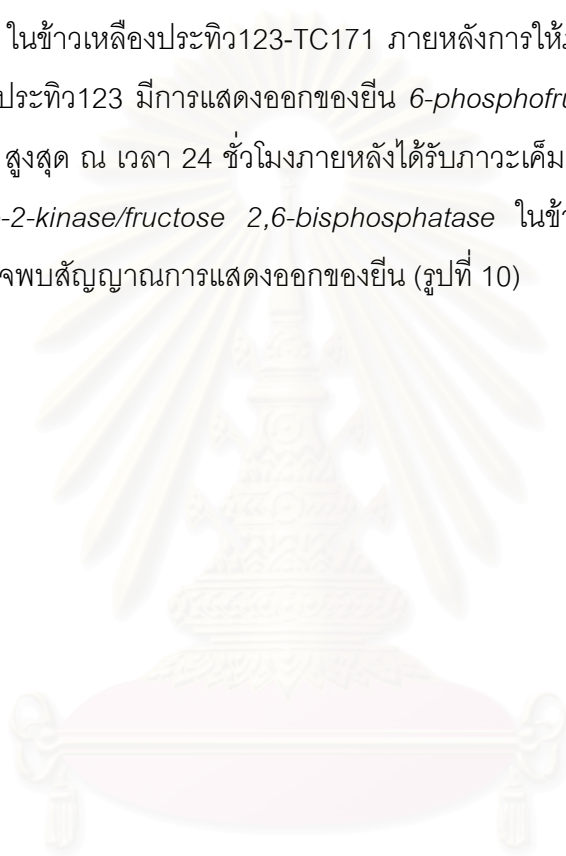
ผลจากการวิเคราะห์ปรากฏว่า ข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ให้ผลในรูปแบบเดียวกันในทุกๆเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ทำการทดลอง โดยการตัด genomic DNA ของข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ด้วยเอนไซม์ *BamHI* ทำให้ probe สามารถเข้าเกาะกับชิ้นส่วนของ genomic DNA สามชิ้นส่วน ซึ่งมีขนาด 6121, 8287 และ 9854 เบส เมื่อใช้ เอนไซม์ *EcoRI* ตัด genomic DNA ของข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ ให้รูปแบบของแถบ DNA สองชิ้นส่วนขนาด 9036 และ 9335 เบส การตัด genomic DNA ด้วยเอนไซม์ *HindIII* ทำให้ probe จับชิ้น genomic DNA ได้เพียงชิ้นส่วนเดียว ซึ่งมีขนาด 5204 เบส (รูปที่ 9)

3.2 การศึกษาแสดงออกของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* หลังจากได้รับภาวะเค็ม

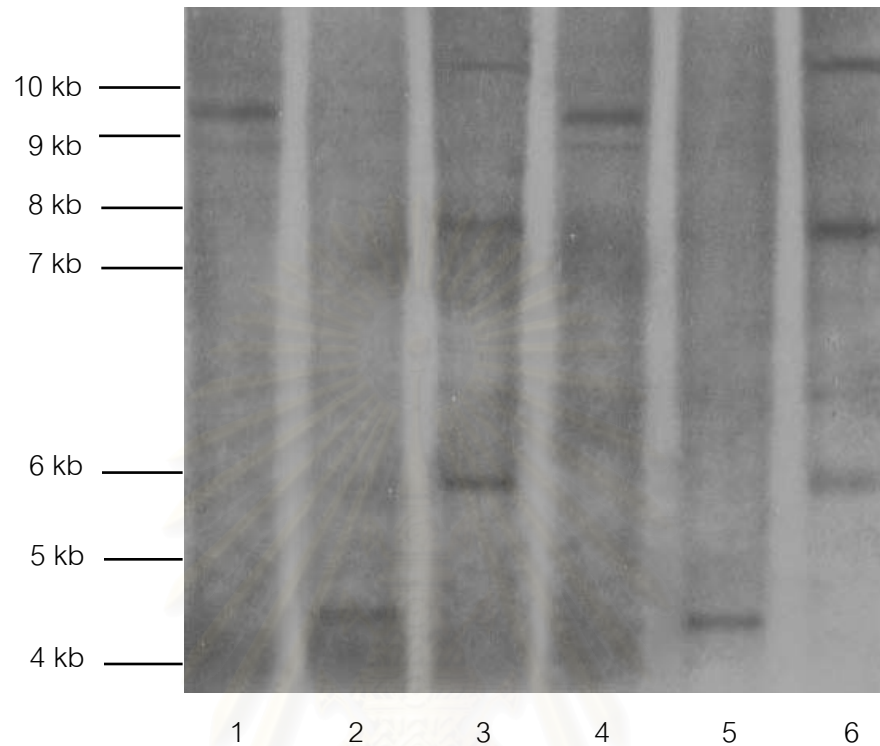
จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* ในข้าวเหลืองประทิว123 และ เหลืองประทิว123-TC171 ด้วยวิธี northern blot analysis โดยใช้ full-length cDNA ของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* เป็นตัวติดตามในการตรวจสอบ

ก่อนการให้ภาวะเค็ม (0 ชั่วโมง) ไม่พบการแสดงออกของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* ในข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ (รูปที่ 10)

ยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* ในข้าวข้าวเหลืองประทิว123-TC171 ตอบสนองต่อภาวะเค็มรวดเร็วกว่าข้าวเหลืองประทิว123 โดยการให้ภาวะเค็มกระตุ้นการแสดงออกของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* ในข้าวเหลืองประทิว123-TC171 ภายหลังจากการให้ภาวะเค็มเป็นเวลา 12 ชั่วโมง สำหรับข้าวเหลืองประทิว123 มีการแสดงออกของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* สูงสุด ณ เวลา 24 ชั่วโมงภายหลังจากได้รับภาวะเค็ม จากนั้นการแสดงออกของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* ในข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ลดต่ำจนไม่สามารถตรวจพบสัญญาณการแสดงออกของยีน (รูปที่ 10)

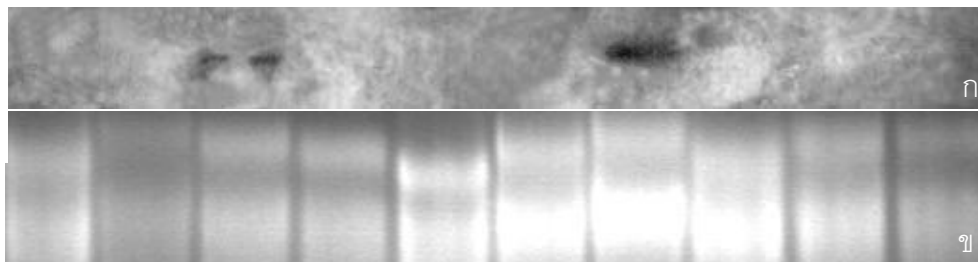


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9 Southern blot analysis ของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 โดยที่

1. = genomic DNA ของเหลืองประทิว123 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*
2. = genomic DNA ของเหลืองประทิว123 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII*
3. = genomic DNA ของเหลืองประทิว123 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI*
4. = genomic DNA ของเหลืองประทิว123-TC171 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*
5. = genomic DNA ของเหลืองประทิว123-TC171 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII*
6. = genomic DNA ของเหลืองประทิว123-TC171 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI*



รูปที่ 10 รูปแบบการแสดงออกของยีน6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase เมื่ออยู่ในภาวะเค็ม

- (ก) northern blot analysis ของข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ เมื่อปลูกในภาวะเค็ม ที่เวลาต่างๆ โดยใช้ full-length cDNA ของยีน6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase เป็นprobe
- (ข) รูปแบบของ total RNA ที่สกัดจากใบข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ เมื่อปลูกในภาวะเค็ม ที่เวลาต่างๆ เมื่อแยกด้วย 1% formaldehyde -agarose gel

โดยที่

1. = เหลืองประทิว123 ก่อนให้ภาวะเค็ม (ชั่วโมงที่ 0)
2. = เหลืองประทิว123 หลังให้ภาวะเค็ม 12 ชั่วโมง
3. = เหลืองประทิว123 หลังให้ภาวะเค็ม 24 ชั่วโมง
4. = เหลืองประทิว123 หลังให้ภาวะเค็ม 48 ชั่วโมง
5. = เหลืองประทิว123 หลังให้ภาวะเค็ม 72 ชั่วโมง
6. = เหลืองประทิว123-TC171 ก่อนให้ภาวะเค็ม (ชั่วโมงที่ 0)
7. = เหลืองประทิว123-TC171 หลังให้ภาวะเค็ม 12 ชั่วโมง
8. = เหลืองประทิว123-TC171 หลังให้ภาวะเค็ม 24 ชั่วโมง
9. = เหลืองประทิว123-TC171 หลังให้ภาวะเค็ม 48 ชั่วโมง
10. = เหลืองประทิว123-TC171 หลังให้ภาวะเค็ม 72 ชั่วโมง

3. ผลของภาวะเค็มต่อกิจกรรมของเอนไซม์ 6-phosphofructo-2-kinase เอนไซม์ fructose 2,6-bisphosphatase และ ปริมาณ fructose-2,6-bisphosphate

3.1 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ 6-phosphofructo-2-kinase และเอนไซม์ fructose 2,6-bisphosphatase

ภาวะเค็มส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ 6-phosphofructo-2-kinase ในข้าวเหลืองประทิว123 เพิ่มขึ้นในวันที่ 9 ของการทดลอง (ตารางที่ 9, รูปที่ 11)

ก่อนการทดลองให้ภาวะเค็ม กิจกรรมของเอนไซม์ fructose 2,6-bisphosphatase ในข้าวเหลืองประทิว123 สูงกว่าข้าวเหลืองประทิว123-TC171 อย่างมีนัยสำคัญ การให้ภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วันส่งผลกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ fructose 2,6-bisphosphatase ในข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ โดยข้าวเหลืองประทิว123 มีกิจกรรมของเอนไซม์ fructose 2,6-bisphosphatase สูงกว่าในข้าวเหลืองประทิว123-TC171 (ตารางที่ 10, รูปที่ 12)

อย่างไรก็ตามหากพิจารณาถึงอัตราส่วนของกิจกรรมระหว่างเอนไซม์ 6-phosphofructo-2-kinase และเอนไซม์ fructose 2,6-bisphosphatase พบว่าเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 3 วัน ความเค็มมีผลให้อัตราส่วนของกิจกรรมของเอนไซม์ 6-phosphofructo-2-kinase และเอนไซม์ fructose 2,6-bisphosphatase ของข้าวเหลืองประทิว123-TC171 มีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 11, รูปที่ 13)

3.2 การศึกษาปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate

ปริมาณของ fructose 2,6-bisphosphate ในข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ มีแนวโน้มลดลงภายหลังจากการทดลองให้ภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วัน ซึ่งข้าวเหลืองประทิว123-TC171 มีแนวโน้มการลดลงของ fructose 2,6-bisphosphate ชัดเจนกว่าข้าวเหลืองประทิว 123 โดยข้าวเหลืองประทิว 123 และข้าวเหลืองประทิว123-TC171 มีปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate ลดต่ำลง 30.34 และ 65.27% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวสายพันธุ์เดียวกัน ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่ไม่มีไฮเดียมคลอไรด์ (ตารางที่ 12, รูปที่ 14)

ตารางที่ 9 กิจกรรมของเอนไซม์ 6-phosphofructo 2-kinase ในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 %(W/V) เป็นเวลา 9 วัน (mean \pm standard error)

ระยะเวลา(วัน)	กิจกรรมของเอนไซม์ 6-phosphofructo 2-kinase (pmole fructose 2,6-bisphosphate mg chl ⁻¹ min ⁻¹) \pm standard error			
	เหลืองประทิว123		เหลืองประทิว123-TC171	
	0%NaCl	0.5%NaCl	0%NaCl	0.5%NaCl
0	0.53 \pm 0.09 ^{aB}	0.53 \pm 0.09 ^{aB}	0.54 \pm 0.15 ^{aB}	0.54 \pm 0.15 ^{aA}
3	1.29 \pm 0.23 ^{aA}	0.83 \pm 0.31 ^{aB}	2.31 \pm 1.10 ^{aA}	0.58 \pm 0.24 ^{aA}
9	0.90 \pm 0.34 ^{bAB}	4.06 \pm 1.51 ^{aA}	0.27 \pm 0.05 ^{bB}	0.82 \pm 0.20 ^{bA}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)
 ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 10 กิจกรรมของเอนไซม์ fructose 2,6-bisphosphatase ในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 %(W/V) เป็นเวลา 9 วัน (mean \pm standard error)

ระยะเวลา(วัน)	กิจกรรมของเอนไซม์ fructose 2,6-bisphosphatase (pmole fructose 2,6-bisphosphate mg chl ⁻¹ min ⁻¹) \pm standard error			
	เหลืองประทิว123		เหลืองประทิว123-TC171	
	0%NaCl	0.5%NaCl	0%NaCl	0.5%NaCl
0	1.01 \pm 0.09 ^{aA}	1.01 \pm 0.09 ^{aB}	0.53 \pm 0.16 ^{bB}	0.53 \pm 0.16 ^{bB}
3	1.09 \pm 0.05 ^{aA}	1.09 \pm 0.01 ^{aB}	0.76 \pm 0.12 ^{bAB}	0.85 \pm 0.11 ^{abAB}
9	1.55 \pm 0.49 ^{abA}	2.60 \pm 0.39 ^{aA}	1.27 \pm 0.20 ^{bA}	1.40 \pm 0.20 ^{bA}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.05$)
 ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.05$)

ตารางที่ 11 อัตราส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ 6-phosphofructo 2-kinase/ fructose 2,6-bisphosphatase ในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 %(W/V) เป็นเวลา 9 วัน (mean ± standard error)

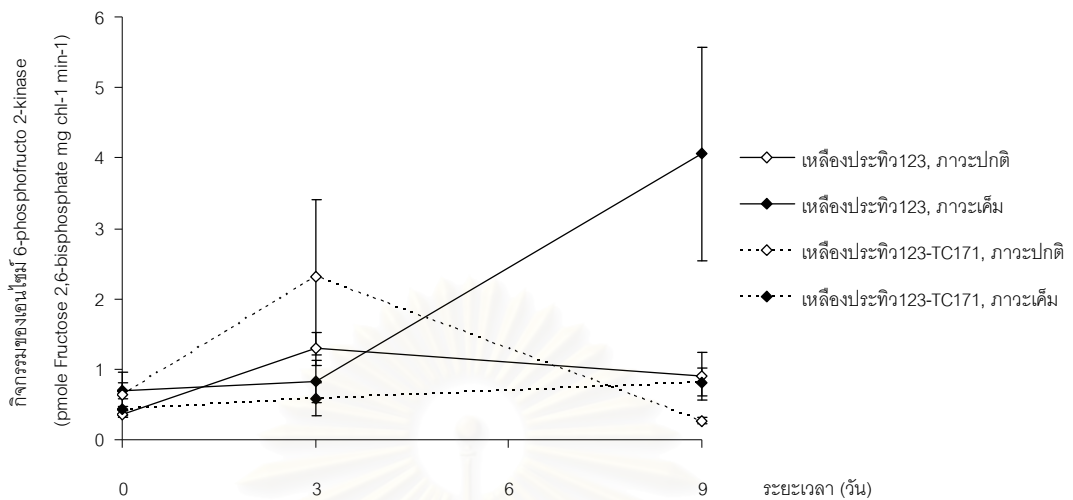
ระยะเวลา(วัน)	อัตราส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ 6-phosphofructo 2-kinase /fructose 2,6-bisphosphatase ± standard error			
	เหลืองประทิว123		เหลืองประทิว123-TC171	
	0%NaCl	0.5%NaCl	0%NaCl	0.5%NaCl
0	0.57±0.14 ^{aB}	0.57±0.14 ^{aA}	1.63±0.53 ^{aAB}	1.63±0.53 ^{aA}
3	1.21±0.27 ^{abA}	0.75±0.28 ^{bA}	2.75±0.87 ^{aA}	0.76±0.37 ^{bA}
9	0.61±0.11 ^{abB}	1.76±0.80 ^{aA}	0.22±0.04 ^{bB}	0.63±0.21 ^{abA}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.05$)
 ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.05$)

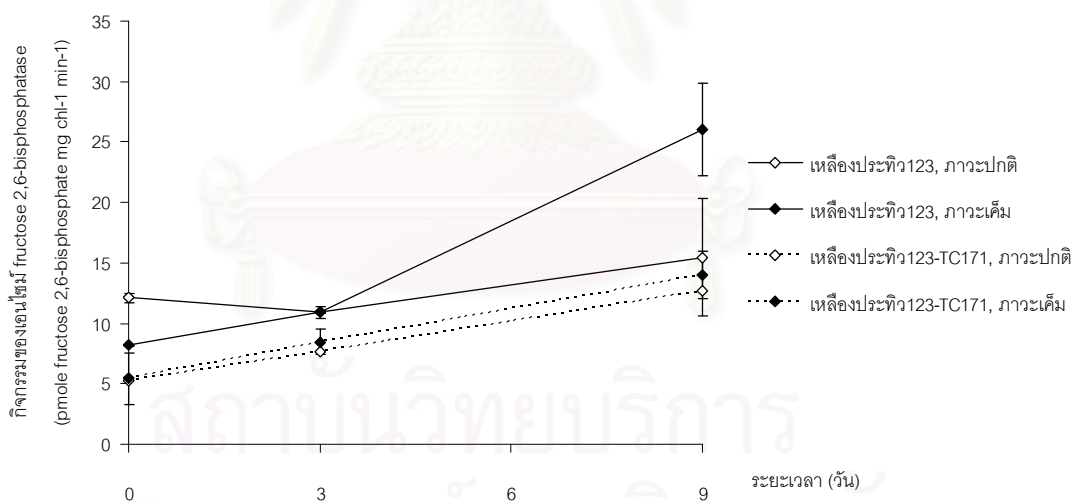
ตารางที่ 12 ปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate ในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 % (W/V) เป็นเวลา 9 วัน (mean \pm standard error)

ระยะเวลา(วัน)	fructose 2,6-bisphosphate ($\mu\text{mole mg chl}^{-1}$) \pm standard error			
	เหลืองประทิว123		เหลืองประทิว123-TC171	
	0%NaCl	0.5%NaCl	0%NaCl	0.5%NaCl
0	5.47 \pm 2.17 ^{aA}	4.42 \pm 0.75 ^{aA}	3.94 \pm 2.23 ^{aA}	5.35 \pm 2.26 ^{aA}
3	5.18 \pm 0.73 ^{aA}	4.77 \pm 1.45 ^{aA}	2.27 \pm 1.29 ^{aA}	2.20 \pm 0.57 ^{aA}
9	5.41 \pm 0.77 ^{abA}	3.77 \pm 1.12 ^{bcA}	7.07 \pm 1.30 ^{aA}	1.68 \pm 0.11 ^{cA}

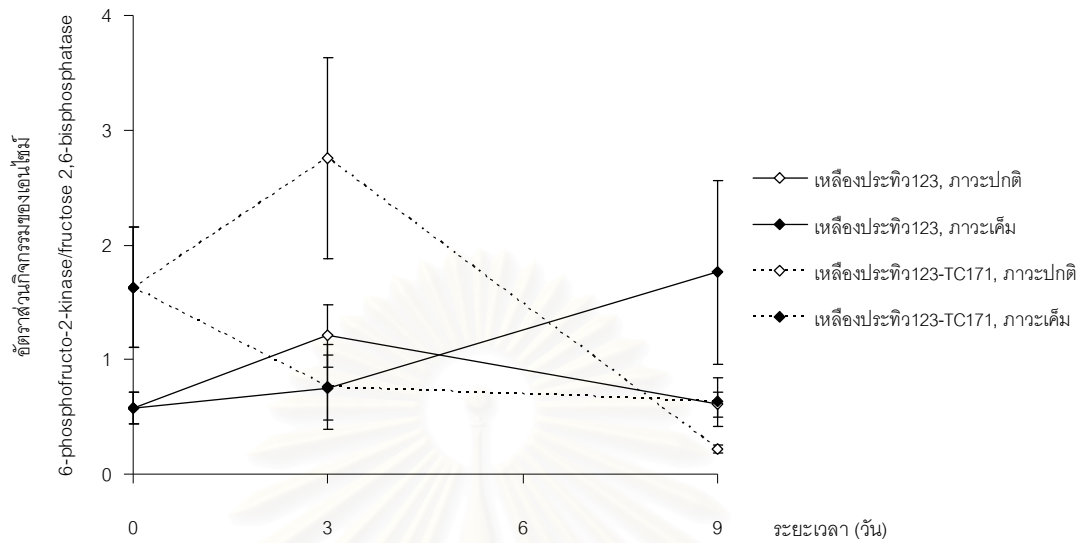
* ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)
 ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)



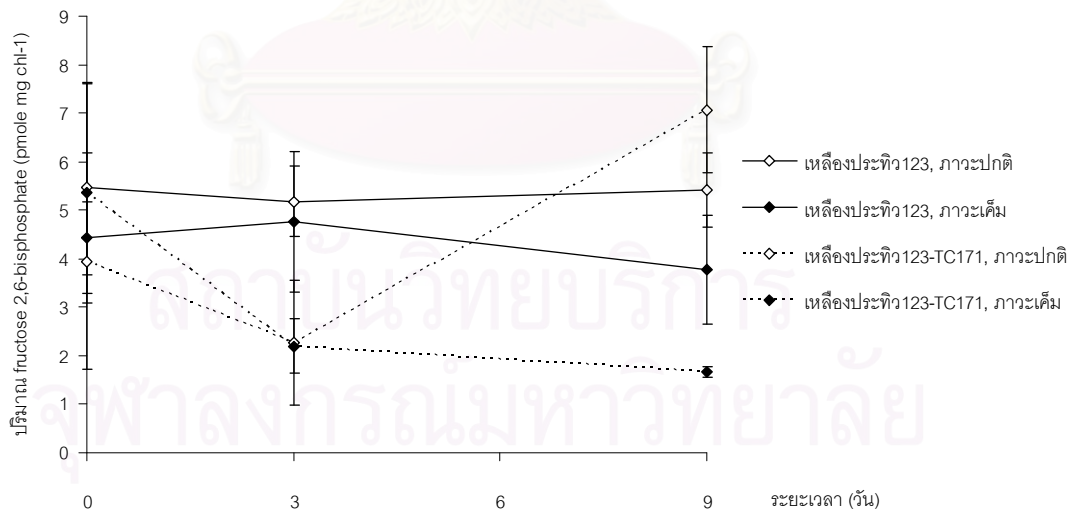
รูปที่ 11 กิจกรรมของเอนไซม์ 6-phosphofructo 2-kinase ในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว 123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 % (W/V) เป็นเวลา 9 วัน (mean \pm standard error)



รูปที่ 12 กิจกรรมของเอนไซม์ fructose 2,6-bisphosphatase ในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 % (W/V) เป็นเวลา 9 วัน (mean \pm standard error)



รูปที่ 13 อัตราส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ 6-phosphofructo 2-kinase/ fructose 2,6-bisphosphatase ในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123 TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีไซโตเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5% (W/V) เป็นเวลา 9 วัน (mean \pm standard error)



รูปที่ 14 ปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate ในเนื้อเยื่อใบของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีไซโตเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 % (W/V) เป็นเวลา 9 วัน (mean \pm standard error)

บทที่ 5

อภิปรายการทดลอง

1. การศึกษาผลของภาวะเค็มต่อการเติบโตของข้าวและปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบข้าว

1.1. การศึกษาผลของภาวะเค็มต่อการเติบโตของข้าว

ภาวะเค็มส่งผลต่อการทำงานของพืชเนื่องจากส่งผลให้เกิดอาการขาดน้ำ และ ความไม่สมดุลของไอออนภายในเซลล์ เมื่อพิจารณาการทำงานระดับเซลล์ พืชหลายชนิดมีการ เติบโตลดลง เนื่องจากอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงที่ลดลง (Reddy และคณะ, 2004) อีกทั้ง ไอออนของเกลือยังเข้าทำลายโครงสร้างของโปรตีนทำให้โปรตีนเสียสภาพ เซลล์จึงไม่สามารถทำ กิจกรรมได้ตามปกติ (Hasegawa และคณะ, 2000)

เมื่อพิจารณาจากค่าน้ำหนักแห้งของข้าวเหลืองประทิว123 ชุดการทดลองที่ให้ ภาวะเค็มพบว่าการเติบโตต่ำกว่าข้าวเหลืองประทิว123 ในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ คาดว่า การเติบโตที่ลดลงของข้าวเหลืองประทิว123 ในภาวะเค็มมาจากการหรีปากใบเพื่อปรับตัวเพื่อลด การสูญเสียน้ำภายในต้น และยับยั้งการลำเลียงไอออนที่เป็นพิษเข้าสู่ต้นพืช (Hasegawa และ คณะ, 2000) แต่การตอบสนองดังกล่าวส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช (Reddy และคณะ, 2004) โดยส่งผลให้ความต้านทานบริเวณปากใบสูงขึ้นเป็นผลให้ความสามารถในการ ตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ลดลง และการเติบโตของพืชถูกยับยั้ง (Sibole และคณะ, 1998)

อย่างไรก็ตามในข้าวเหลืองประทิว123-TC171 ยังสามารถเติบโตได้ดีใน สารละลายที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5% โดยพบว่ามีค่าน้ำหนักแห้งไม่แตกต่างกับชุดควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ การที่ข้าวเหลืองประทิว123-TC171 รักษาระดับของมวลชีวภาพไว้ได้ดีอาจมี ความเกี่ยวข้องกับปริมาณของการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้น ในภาวะเค็มข้าวเหลืองประทิว123-TC171 มีทิศทางของเมแทบอลิซึมที่แตกต่างจากภาวะปกติ ภาวะเค็มจะกระตุ้นข้าวเหลือง ประทิว123-TC171 มีสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสสูงกว่าข้าวเหลืองประทิว123-TC171 ในภาวะปกติ กระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสที่เกิดในไซโตพลาสซึม (Quick และคณะ, 1989) นั้นต้องมีการลำเลียง triose phosphate ที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงออกมาจากคลอโรพลาสต์ ซึ่งคาดว่า การสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้นนั้นน่าจะมีผลผลักดันให้เกิดการลำเลียง triose phosphate ออกมามากขึ้นและส่งผลให้เกิดกระบวนการ Calvin cycle ได้ดีขึ้น อีกทั้งการ

สังเคราะห์ซูโครสในไซโตพลาสซึมมีส่วนช่วยรักษาระดับความเข้มข้นของ inorganic phosphate (Pi) ในคลอโรพลาสต์เนื่องจากการสังเคราะห์ซูโครสทำให้เกิดการผลักดันโมเลกุล Pi เข้าสู่คลอโรพลาสต์เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงต่อไป (Leegood, 1999) โดยความเข้มข้นของ Pi ในคลอโรพลาสต์เป็นปัจจัยหนึ่งที่ควบคุมอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช จากการทดลองสกัดคลอโรพลาสต์ของ spinach (*Spinacia oleracea*) เพื่อทำการศึกษพบว่าเมื่อความเข้มข้นของ Pi ในคลอโรพลาสต์ลดลงจะส่งผลให้การสังเคราะห์ด้วยแสงถูกยับยั้ง (Cockburn และคณะ, 1967)

อีกทั้งการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสยังส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยการศึกษาในพืชตัดแปลงพันธุกรรมที่มีการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสสูงขึ้นจากการทำ over-expression ยีน sucrose-phosphate synthase (EC 2.4.1.14) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ควบคุม rate limiting step ของการสังเคราะห์ซูโครส โดยพบว่าพืชตัดแปลงพันธุกรรมมีอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงสูงขึ้น (Micallef และคณะ, 1995) ซึ่งส่งผลให้ต้นพืชตัดแปลงพันธุกรรมมีผลผลิตสูงกว่าในต้นปกติ (Lamporte และคณะ, 1997) จึงเป็นไปได้ว่าข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 ซึ่งมีความสามารถในการสังเคราะห์ซูโครสได้สูงกว่าข้าวพันธุ์เดิม เนื่องจากมีความสามารถในการรักษาการสังเคราะห์ด้วยแสงไว้ได้ดีขณะที่ได้รับภาวะเค็ม ทำให้ยังคงรักษาความสามารถในการเพิ่มมวลชีวภาพไว้ได้

ในภาวะเค็มสารละลายภายนอกมีค่า water potential ต่ำ ส่งผลให้พืชดูดซึมน้ำไปใช้ได้ยาก (Taiz และ Zeiger, 2006) ทำให้พืชจำเป็นต้องเกิดการปรับตัวเช่นลดพื้นที่ใบและหุบปากใบเพื่อเป็นการลดการสูญเสียน้ำ (Reddy และคณะ, 2004) การสะสมสาร osmolyte จัดเป็นการปรับตัวหนึ่งของพืชเมื่ออยู่ในภาวะเค็ม โดยสาร osmolyte เป็นกลุ่มสารอินทรีย์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ มีการสังเคราะห์สารเหล่านี้เพิ่มสูงขึ้นเมื่อพืชอยู่ในภาวะ osmotic stress โดยสาร osmolyte ที่พืชสร้างได้แก่ น้ำตาล polyol และกรดอะมิโน (Hare และคณะ, 1998) จากผลการศึกษาพบว่าข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์เพิ่มการสะสมซูโครสเพิ่มขึ้นภายหลังการทดลองให้ภาวะเค็ม และพบว่าในวันที่ 9 ของการทดลองให้ภาวะเค็มข้าวเหลืองประทิว 123 มีปริมาณน้ำภายในต้นเฉลี่ย 83.1% ขณะที่ข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 มีปริมาณน้ำเฉลี่ย 84.8% ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงส่งผลให้ข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 มีค่าของน้ำหนักสดสูงกว่าข้าวเหลืองประทิว 123 ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้น ในข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 ซึ่งเป็นข้าวที่มีความสามารถในการทนต่อภาวะเค็มมีการสะสมน้ำตาลซูโครสสูงกว่าข้าวเหลืองประทิว 123 โดยน้ำตาลซูโครสจัดเป็นสาร osmolyte ประเภทหนึ่งซึ่งมีประโยชน์ต่อการช่วยปรับค่า water potential ภายในเซลล์ (osmotic adjustment) ทั้งนี้เพื่อให้พืชที่อยู่ในภาวะเค็ม

สามารถดึงน้ำมาใช้ได้ และสามารถดำรงชีวิตในภาวะเครียดได้ (Xiong และ Zhu, 2002) จึงสามารถสรุปได้ว่าพืชที่ทนต่อภาวะเค็มมีความสามารถในการสะสมซูโครสได้มากกว่า จึงสามารถรักษาสมดุลของน้ำภายในต้นได้ดีกว่า

จากผลการศึกษาคาร์บอนไดออกไซด์ของข้าวภายใต้ภาวะเค็ม แสดงให้เห็นว่าข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 เป็นข้าวที่มีความสามารถให้การทนต่อภาวะเค็มได้ดีกว่าข้าวเหลืองประทิว 123 สอดคล้องรายงานก่อนหน้านี้ ซึ่งทดสอบความสามารถในการทนแล้งและเค็มในข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ โดยได้สรุปไว้ว่าข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 เป็นข้าวที่มีทั้งลักษณะทนเค็มและทนแล้ง (Thikart และคณะ, 2005)

1.2. การศึกษาผลของภาวะเค็มต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบข้าว

ในกลุ่มพืชที่ไม่มีความสามารถในการทนเค็ม การได้รับภาวะเค็มอย่างรุนแรงหรือเป็นเวลานาน ส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบลดต่ำ เนื่องจากภาวะเค็มส่งผลให้ไทลาคอยด์เมมเบรนถูกทำลาย (Hernandez และคณะ, 1999) อย่างไรก็ตามการที่พืชมีการลดปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ เป็นการปรับตัวเพื่อลดปริมาณการดูดกลืนแสงที่มากเกินไป จัดเป็นการตอบสนองเพื่อเป็นการป้องกันการเกิด photoinhibition (Morales และคณะ, 2006) จากผลการศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์ในข้าวเหลืองประทิว 123 และข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 ชุดการทดลองที่ให้ภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วัน พบว่าข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์มีปริมาณคลอโรฟิลล์ใกล้เคียงกับต้นที่ไม่ได้รับภาวะเค็มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เป็นผลจากความเข้มของแสงที่ใช้ในการทดลอง โดยการทดลองนี้ใช้แสงธรรมชาติ ความเข้มแสงเฉลี่ยตลอดวันมีค่าประมาณ $92.79-99.18 \mu\text{mole photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ซึ่งจัดเป็นความเข้มแสงต่ำ (Lu และคณะ, 2002) สอดคล้องกับการทดลองในข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) (Mishra และคณะ, 1991) และ *Suaeda salsa* (Lu และคณะ, 2002) พบว่าเมื่อเลี้ยงด้วยความเข้มแสงต่ำ ภาวะเค็มไม่ส่งผลต่อปริมาณคลอโรฟิลล์

ภาวะเค็มส่งผลต่อปริมาณคลอโรฟิลล์อย่างชัดเจนก็ต่อเมื่อเป็นการให้ภาวะเค็มร่วมกับการเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงสูง ภายใต้ภาวะที่มีความเข้มแสงสูงสามารถกระตุ้น light reaction มีกิจกรรมสูงขึ้น แต่ขาดตัวรับอิเล็กตรอนเนื่องจากพืชมีการปิดปากใบตอบสนองต่อภาวะเค็ม กระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จึงถูกยับยั้ง ภาวะดังกล่าวส่งผลให้ reactive

oxygen species ในคลอโรพลาสต์เพิ่มขึ้น เป็นผลให้ไทลาคอยด์เมมเบรนถูกทำลาย (Hernandez และคณะ, 1999) กระตุ้นการสลายตัวของ light harvesting (Morales และคณะ, 2006) อีกทั้งภายใต้ภาวะที่มีความเข้มแสงสูงสามารถกระตุ้นให้พืชเพิ่มการดูดซึมน้ำ อีกทั้งเป็นการเพิ่มการดูดซึมน้ำเกลือเข้าสู่ต้นมากขึ้น เกิดความเป็นพิษของการที่มีไอออนเข้ามาสะสม (Broetto และคณะ, 2002)

2. การศึกษาผลของภาวะเค็มที่มีต่อปริมาณแป้ง น้ำตาลทั้งหมด และน้ำตาลซูโครสในใบข้าว

จากผลการศึกษาการให้ภาวะเค็มส่งผลให้ข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงคาร์โบไฮเดรตในใบในทิศทางเดียวกัน โดยภาวะเค็มยับยั้งการสังเคราะห์แป้งในคลอโรพลาสต์ ในขณะที่กระตุ้นกระบวนการสร้างน้ำตาลให้เพิ่มขึ้น ซึ่งพบว่าน้ำตาลทั้งหมดที่สูงขึ้นนั้นเป็นผลมาจากการเพิ่มเฉพาะน้ำตาลซูโครส ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อพิจารณา non-sucrose sugar ของข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ พบว่าน้ำตาลดังกล่าวไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญภายหลังการให้ภาวะเค็ม เช่นเดียวกับการตอบสนองต่อภาวะ osmotic stress ใน *Phaseolus vulgaris* (Vassey และ Sharkey, 1989) spinach (*Spinacia oleracea* L.) (Quick และคณะ, 1989) *Atriplex halimis* L. (Martinaz และคณะ, 2004) และมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) (Geigerberger และคณะ, 1997) โดยพบว่าภาวะเครียดชักนำให้ผลผลิตที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยแสงเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลซูโครสเพิ่มขึ้น และลดสัดส่วนการสร้างแป้งลงอย่างมีนัยสำคัญ

โมเลกุล fructose 2,6-bisphosphate เป็น cellular signal ที่สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงทุกกลุ่ม โดยหน้าที่สำคัญของ fructose 2,6-bisphosphate คือเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ pyrophosphate-dependent phosphofructokinase (EC 2.7.1.90) และสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase (EC 3.1.3.11) (Nielsen และคณะ, 2004) อาจกล่าวได้ว่า fructose 2,6-bisphosphate เป็นโมเลกุลที่ควบคุมการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครส (Stitt, 1990a)

จากผลการศึกษาการให้ภาวะเค็มในข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 ซึ่งเป็นข้าวที่มีความสามารถในการทนเค็ม พบว่าปริมาณของ fructose 2,6-bisphosphate ลดลงภายหลังจากการทดลองให้ภาวะเค็ม ส่งผลให้ข้าวมีการสร้างน้ำตาลซูโครสเพิ่มขึ้นเนื่องจากเอนไซม์ cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase ถูกยับยั้งน้อยลง ทำให้เกิดการผลักดันผลผลิตจากการสังเคราะห์ด้วยแสงเข้าสู่ไซโตพลาสซึม สนับสนุนการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสให้เพิ่มขึ้น อีกทั้งการสังเคราะห์

น้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้นในภาวะเค็มอาจเป็นผลมาจากการควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์ sucrose phosphate synthase (EC 2.4.1.14) ซึ่งควบคุมปฏิกิริยาที่เป็น rate limiting step ของการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครส เนื่องจากภาวะเค็มสามารถชักนำให้เกิด phosphorylation ของเอนไซม์ และส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้น (Winter และ Huber, 2000)

ในทางกลับกันผลจากกระบวนการดังกล่าวส่งผลให้การสังเคราะห์แป้งภายในคลอโรพลาสต์เกิดขึ้นน้อยลง โดยปริมาณแป้งที่ลดลงอันเนื่องมาจากปริมาณสารตั้งต้นที่ลดลงแล้ว ยังเป็นผลจากการเอนไซม์ ADPglucose pyrophosphorylase (EC 2.7.7.9) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ควบคุมปฏิกิริยาการเปลี่ยน glucose 1-phosphate ไปเป็น ADP-glucose เป็นขั้น rate limiting step ของการสังเคราะห์แป้งโดยการถูกยับยั้ง เนื่องจากค่าเฉลี่ย triose phosphate ออกจากคลอโรพลาสต์ ส่งผลให้อัตราส่วนระหว่าง 3PGA/Pi ภายในคลอโรพลาสต์ลดต่ำลง ส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ADPglucose pyrophosphorylase (Copeland และ Preiss, 1981)

การควบคุมทิศทางการเปลี่ยนแปลงของผลผลิตจากการสังเคราะห์ด้วยแสงไปยังไซโตพลาสซึมในภาวะเค็มน่าจะมีความมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการทนเค็มของพืช จากผลการศึกษาอัตราส่วนระหว่างน้ำตาลซูโครสและแป้งของข้าวสาลีพันธุ์ทนเค็ม เหลืองประทิว 123-TC171 มีค่าสูงกว่าในข้าวเหลืองประทิว123 อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับผลศึกษาโครงสร้างภายในใบของมะเขือเทศที่ได้รับภาวะเค็มพบว่าในมะเขือเทศพันธุ์ที่มีความทนต่อภาวะเค็มเม็ดแป้งในคลอโรพลาสต์ลดขนาดลงอย่างชัดเจนภายหลังการให้ภาวะเค็ม โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงของขนาดเม็ดแป้งของพันธุ์ที่ไม่ทน (Sam และคณะ, 2003)

การหาความสัมพันธ์ระหว่างสองตัวแปรนี้โดยอาศัยสมการถดถอยเชิงเส้น พบว่าอัตราส่วนของแป้งและน้ำตาลซูโครส และปริมาณของ fructose 2,6-bisphosphate ได้ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเท่ากับ 0.78 โดยมีค่า $p=0.067$ (รูปที่ 15) จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนซูโครสและแป้งและปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate มีความสัมพันธ์ในระดับสูง ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate ในภาวะเค็ม เป็นการปรับตัวในระดับโมเลกุลของพืช ซึ่งส่งผลให้พืชมีความสามารถในการทนเค็มสูงขึ้น โดยการผลักดันให้เซลล์เพิ่มการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสในภาวะเค็มน่าจะเป็นลักษณะที่ทำให้พืชเกิดการทนต่อภาวะเค็ม เนื่องจากน้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้นในภาวะเค็มนอกจากมีหน้าที่ในกระบวนการปรับค่า water potential ภายในเซลล์แล้ว (Xiong และ Zhu, 2002) น้ำตาลซูโครสยังทำหน้าที่ในกระบวนการ osmoprotection ช่วยในการรักษาโครงสร้างภายในเซลล์เช่น เซลล์เมมเบรน และโปรตีน (Street และคณะ, 2006)

อย่างไรก็ตามผลการทดลองใน *Bruguiera gymnorrhiza* (Banzai และคณะ, 2003) และ sorghum (Reddy, 1996) พบว่าการให้ภาวะเค็มและภาวะแล้งชักนำให้ปริมาณของ fructose 2,6-bisphosphate เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เซลล์มีการสะสมแป้งสูงขึ้น ลดการสร้างน้ำตาลซูโครส ในทางตรงข้ามการศึกษาในข้าวพบว่า ภาวะเค็มและภาวะแล้งชักนำให้ข้าวมีการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสเพิ่มขึ้น (Garcia และคณะ, 1997; วรรณญา คำปิ่น, 2541) โดยพืชแต่ละชนิดมีรูปแบบการตอบสนองต่อภาวะเค็มที่แตกต่างกัน เนื่องจากลักษณะการทนเค็มในพืชเป็นลักษณะที่มีความซับซ้อน เกิดจากการทำงานร่วมของยีนหลายกลุ่ม ซึ่งรูปแบบการปรับตัวเกิดขึ้นในพืชแต่ละชนิดเป็นผลจากการวิวัฒนาการกลไกในการทนเค็มที่เฉพาะตัว (Tester และ Davenport, 2003)

3. การศึกษาชีววิทยาระดับโมเลกุลของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase*

3.1 การศึกษา organization ของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* ในจีโนมของข้าว

ข้าวเหลืองประทิว123-TC171 เป็นข้าวที่เกิดจากการแปรของเซลล์ร่างกายของข้าวเหลืองประทิว123 ในขณะที่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเป็นผลมาจากการเกิดมิวเทชันในระดับจีโนม ส่งผลให้ข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์มีความสามารถในการทนแล้งและเค็มแตกต่างกัน (Thikart และคณะ, 2005) อีกทั้งมีการแสดงออกของยีนที่ต่างกันในภาวะเค็ม (สมพร มณีประสพสุข, 2547)

การศึกษาจำนวนชุดของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* ในข้าวเหลืองประทิว123และข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม เหลืองประทิว123-TC171 ด้วยเทคนิค Southern blot analysis ผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีดังกล่าวพบว่าการตัด genomic DNA ของข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* ให้รูปแบบของแถบ DNA ขนาด 5204 เบส เพียงแถบเดียวในขณะที่การตัดด้วย *EcoRI* และ *BamHI* ให้รูปแบบของแถบ DNA 2 และ 3 แถบตามลำดับ ซึ่งเป็นแถบที่ความเข้มไม่เท่ากัน โดยตัวตรวจจับในการศึกษา Southern blot analysis ได้ใช้ชิ้นส่วนที่ได้จากการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค differential display ในข้าวเหลืองประทิว123 และข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 ภายใต้ภาวะเค็มที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5% ถูกชักนำการแสดงออกภายหลังการให้ภาวะเค็มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ใช้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลสากลของ EMBL

Database ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบในระดับโปรตีน ด้วยวิธี BLAST Algorithm (Altschul และคณะ, 1997) พบว่าชิ้นส่วนดังกล่าวมีความเหมือนกับยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* ซึ่งมีตำแหน่งบนโครโมโซมแท่งที่ 5 ในจีโนมข้าว (*Oryza sativa* L. cv. Japonica) (สมพร มณีประสพสุข, 2547) อย่างไรก็ตาม probe ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นชิ้นส่วนยีนที่มีขนาด 152 เบสซึ่งมีขนาดเล็กซึ่งสามารถเข้าเกาะได้เฉพาะบนโครโมโซมแท่งที่ 5 ในตำแหน่ง 1248-1339 และ 1947-2004 ดังนั้นเมื่อตัดด้วย genomic DNA ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* จึงปรากฏเป็นแถบ DNA 2 ขนาด การตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI* ให้รูปแบบของแถบ DNA ถึง 3 แถบ อาจมาจากการตัดอย่างไม่สมบูรณ์ของเอนไซม์ ทำให้ปรากฏเป็นแถบขนาดใหญ่เพิ่มขึ้นมา (ภาคผนวก ง) Park และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาซีววิทยาระดับโมเลกุลของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* ในข้าวพบว่ายีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* ที่ปรากฏในจีโนมข้าวมี 2 homologues (PFK1 และ PFK2) ซึ่งมีตำแหน่งบนโครโมโซมแท่งที่ 3 และ 5 ตามลำดับ จึงเป็นไปได้ว่ายีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* ในข้าวเหลืองประทิว123 และ ข้าวเหลืองประทิว123-TC171 มีจำนวนชุดเหมือนกับรายงานของ Park และคณะ (2007) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาวิธีการเดียวกันนี้ใน *Arabidopsis thaliana* (Villadsen และคณะ, 2000) และ *Bruguiera gymnorhiza* (Banzai และคณะ, 2003) พบว่ายีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* มีลักษณะเป็น single copy gene ในจีโนมของพืชดังกล่าว

3.2 การศึกษาแสดงออกของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* หลังจากได้รับภาวะเค็ม

สมพร มณีประสพสุข (2547) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* ภายหลังจากให้ภาวะเค็มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าในข้าวเหลืองประทิว123 และข้าวเหลืองประทิว123-TC171 มีการแสดงออกของยีนดังกล่าวแตกต่างกัน โดยในข้าวเหลืองประทิว123 ไม่พบการแสดงออกในภาวะปกติ แต่ภายหลังได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่งผลให้ยีนมีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้น สำหรับยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* ในข้าวเหลืองประทิว123-TC171 สามารถตรวจพบการแสดงออกเมื่ออยู่ในภาวะปกติ อีกทั้งการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นภายหลังจากที่ข้าวได้รับภาวะเค็ม

ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเพิ่มช่วงเวลาการศึกษาเป็น 0, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ภายหลังการให้ภาวะเค็ม อีกทั้งได้เปลี่ยนตัวติดตามจากชิ้นส่วนของยีนขนาด 152 เบส เป็น full-length cDNA ของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* ของข้าว ซึ่งมีขนาด 3 กิโลเบส (J023003N10, RIKEN institute, Japan) จากผลการศึกษาสามารถตรวจพบสัญญาณการแสดงออกของยีนพบว่ายีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* ในข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์มีรูปแบบการแสดงออกคล้ายคลึงกัน โดยการให้ภาวะเค็มสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนภายใน 12-24 ชั่วโมงหลังจากได้รับภาวะเค็ม จากนั้นการแสดงออกจะลดต่ำลงซึ่งสอดคล้องกับรูปแบบการตอบสนองของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* ในภาวะเค็มของ *Bruguiera gymnorhiza* (Banzai และคณะ, 2003)

ในภาวะเค็มสัญญาณการแสดงออกของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* ของข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 เพิ่มขึ้นรวดเร็วกว่าในข้าวเหลืองประทิว 123 โดยข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 มีสัญญาณการแสดงออกสูงสุดภายหลังจากการให้ภาวะเค็มเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ในขณะที่ข้าวเหลืองประทิว 123 มีสัญญาณการแสดงออกสูงสุดเมื่อให้ภาวะเค็มไปแล้วเวลา 24 ชั่วโมง

ความไวของการตอบสนองต่อภาวะเค็มเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้พืชมีความสามารถทนเค็มแตกต่างกัน โดยพืชที่มีความทนต่อภาวะเค็มสูง สามารถกระตุ้นกระบวนการทางชีวเคมีบางอย่างภายในเซลล์เพื่อตอบสนองต่อภาวะเค็มอย่างรวดเร็ว รวมถึงสามารถกระตุ้นกระบวนการดังกล่าวไว้ได้ล่วงหน้า (Hasegawa และคณะ, 2000) ดังนั้นการตอบสนองของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* ในภาวะเค็มน่าจะแสดงถึงกลไกการตอบสนองต่อที่รวดเร็วและกระบวนการปรับตัวให้ทนทานต่อภาวะเค็มในข้าวเหลืองประทิว 123-TC171

ภาวะเค็มส่งผลให้เกิดการสะสมกรดแอบไซซิก (abscisic acid, ABA) เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อ โดย ABA เป็นฮอร์โมนที่ควบคุมกระบวนการทางสรีรวิทยาหลายกระบวนการในพืช (Taiz และ Zeiger, 2006) อีกทั้งมีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่มีความสำคัญต่อการปรับตัวของพืชในภาวะเค็มเช่นยีน Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกระบวนการสังเคราะห์โพรลีน (พงศธร กล่อมสกุล, 2547) อย่างไรก็ตามการทดลองใน *Bruguiera gymnorhiza* พบว่าภาวะเค็มและภาวะแล้งสามารถชักนำให้ยีน *6-phosphofructo-*

2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น ในทางกลับกันพบว่า ABA ไม่มีผลกระทบต่อการแสดงออกของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* (Banzai และคณะ, 2003) จึงเป็นไปได้ว่ากระบวนการที่ชักนำการแสดงออกของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* ในข้าวเหลืองประทิว123 และข้าวเหลืองประทิว123-TC171 ไม่เกี่ยวข้องกับ ABA

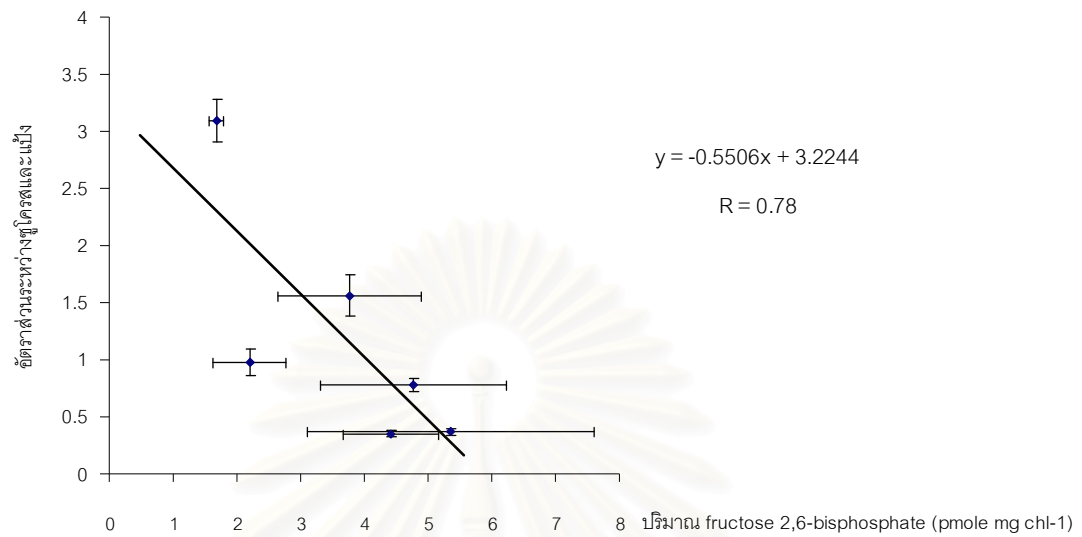
4. ผลของภาวะเค็มต่อกิจกรรมของเอนไซม์ *6-phosphofructo-2-kinase* เอนไซม์ *fructose 2,6-bisphosphatase* และ ปริมาณ *fructose-2,6-bisphosphate*

ปริมาณ *fructose 2,6-bisphosphate* สามารถเปลี่ยนแปลงตามกิจกรรมของการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช (Stitt, 1990a) อีกทั้งสามารถเปลี่ยนแปลงตามปัจจัยแวดล้อมที่ส่งผลต่ออัตราส่วนของกิจกรรมระหว่างเอนไซม์ *6-phosphofructo-2-kinase* และเอนไซม์ *fructose 2,6-bisphosphatase* (Banzai และคณะ, 2003)

โดยปริมาณของ *fructose 2,6-bisphosphate* ภายในเซลล์ควบคุมโดยเอนไซม์ *6-phosphofructo-2-kinase* (EC 2.7.1.105) และเอนไซม์ *fructose 2,6-bisphosphatase* (EC 3.1.3.46) ซึ่งควบคุมปฏิกิริยาการสร้างและสลาย *fructose 2,6-bisphosphate* ตามลำดับ ทั้งสองเอนไซม์มีลักษณะเป็น bifunctional enzyme คือถูก encode จากยีนเดียวกัน อยู่บนสายโพลีเปปไทด์เดียวกัน การศึกษาโครงสร้างสามมิติของโปรตีนพบว่าทั้งสองหน้าที่มีบริเวณเร่ง (catalytic site) แยกส่วน (Nielsen และคณะ, 2004) กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองถูกควบคุมด้วยความเข้มข้นของสารตั้งต้นและรวมถึง allosteric effectors ของเอนไซม์ที่ปรากฏในภายในไซโตพลาสซึม เช่น 3-phosphoglycerate *fructose 6-phosphate* Pi และ *fructose 6-phosphate* (Scott และคณะ, 1995) จากผลการศึกษาในข้าวเหลืองประทิว123-TC171 ปริมาณของ *fructose 2,6-bisphosphate* มีแนวโน้มลดลงหลังจากการทดลองให้ภาวะเค็ม อาจเป็นผลจากการควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์ผ่าน allosteric effectors โดยการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้น เกิดจากลำเลียง triose phosphate มายังไซโตพลาสซึมส่งผลให้อัตราส่วนระหว่าง triose/Pi ในไซโตพลาสซึมเพิ่มสูงขึ้นด้วย ซึ่งอัตราส่วนดังกล่าวเป็นตัวกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ *fructose 2,6-bisphosphatase* และยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ *fructose 6-phosphate,2-kinase* อัตราส่วนระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ *fructose 6-phosphate,2-kinase/ fructose 2,6-bisphosphatase* ลดลงจึงส่งผลให้ปริมาณของ *fructose 2,6-bisphosphate* ในไซโตพลาสซึมลดต่ำลงด้วย (Stitt, 1990b)

โดยการที่ข้าวเหลืองประทิว123-TC171 มีปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate ลดต่ำมากกว่าในข้าวเหลืองประทิว123 เนื่องจากปริมาณการแสดงออกของยีน 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase มีการแสดงออกก่อนการให้ภาวะเค็ม (สมพร มณีประสพสุข, 2547) อีกทั้งในภาวะเค็มการแสดงออกของยีนดังกล่าวสามารถเพิ่มขึ้น รวดเร็วกว่าข้าวเหลืองประทิว123 จึงอาจส่งผลให้ปริมาณเอนไซม์ fructose 6-phosphate,2-kinase/ fructose 2,6-bisphosphatase ในข้าวเหลืองประทิว123-TC171 สูงกว่าข้าวเหลืองประทิว 123 (Rosa และคณะ, 1992)

จากการศึกษาใน Arabidopsis พบว่าเอนไซม์ทั้งสองมีการควบคุมแบบ post-transcriptional modification จากการเกิด phosphorylation และจับกับโปรตีน14-3-3 (Kulma และคณะ, 2004)โดยตำแหน่งที่คาดว่าน่าจะเป็นบริเวณที่เกิดปฏิกิริยา phosphorylation คือ Ser220 และ Ser303 ในบริเวณ N-terminus ของสายโพลีเปปไทด์ (Nielsen และคณะ, 2004) จากการศึกษ N-terminus truncation ของยีน 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase ใน Arabidopsis พบว่าการเปลี่ยนแปลงบริเวณ N-terminus ซึ่งเป็นส่วนที่เกิด phosphorylation นั้นส่งผลต่ออัตราส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสอง (Villadsen และ Neilsen, 2001) Banzai และคณะ (2003) ได้เสนอว่าการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ 6-phosphofructo-2-kinase และเอนไซม์ fructose 2,6-bisphosphatase ในภาวะเค็มน่าจะเกิดจากกระบวนการ covalent modification ของโปรตีนจากปฏิกิริยา phosphorylation เนื่องจากการเกิด phosphorylation ของโปรตีนดังกล่าวไม่ได้ส่งผลเพิ่มหรือลดกิจกรรมของทั้งสองเอนไซม์ พร้อมๆกัน หากแต่เป็นการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ Kulma และคณะ (2004) คาดว่าการเกิด protein phosphorylation ในแต่ละตำแหน่งส่งผลต่ออัตราส่วนการทำงานของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ดังนั้นในการตอบสนองต่อภาวะเค็มในข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ นี้ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนของกิจกรรมของเอนไซม์6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase ที่แตกต่างกัน ก็อาจเป็นผลมาจากการควบคุมในระดับ post-transcriptional modification ที่แตกต่างกันด้วย นอกเหนือไปจากการควบคุมในระดับ transcription ดังกล่าวข้างต้น



รูปที่ 15 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate และอัตราส่วนของน้ำตาลซูโครสและแฟร็กโตสของข้าวเหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีไซโตเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 % (W/V) เป็นเวลา 9 วัน (mean \pm standard error)

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

1. การศึกษาผลของภาวะเค็มต่อการเติบโตของข้าวและปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบข้าว

การให้ภาวะเค็มด้วยสารละลายธาตุอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5% เป็นเวลา 9 วันไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณคลอโรฟิลล์ในข้าวทั้งในข้าวเหลืองประทิว 123 และข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 อย่างไรก็ตามข้าวเหลืองประทิว 123 ที่เลี้ยงในภาวะเค็มมีการเติบโตต่ำกว่าชุดควบคุม โดยต้นข้าวมีน้ำหนักแห้งต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 สามารถเติบโตได้อย่างปกติ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการทนเค็มที่แตกต่างกันของข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์

2. การศึกษาผลของภาวะเค็มที่มีต่อปริมาณแป้ง น้ำตาลทั้งหมด และน้ำตาลซูโครสในใบข้าว

จากผลการศึกษาการให้ภาวะเค็มส่งผลเกิดการเปลี่ยนแปลงของคาร์โบไฮเดรตในใบข้าว โดยภาวะเค็มยับยั้งการสังเคราะห์แป้งในคลอโรพลาสต์ ในขณะที่กระตุ้นกระบวนการสร้างน้ำตาลให้เพิ่มขึ้น โดยน้ำตาลทั้งหมดที่สูงขึ้นนั้นเป็นผลมาจากการเพิ่มเฉพาะน้ำตาลซูโครส การเปลี่ยนแปลงของคาร์โบไฮเดรตมีความสัมพันธ์ต่อความสามารถในการทนต่อภาวะเค็ม โดยในข้าวเหลืองประทิว 123-TC171 มีอัตราส่วนระหว่างน้ำตาลซูโครสและแป้งสูงกว่าข้าวเหลืองประทิว 123 อย่างมีนัยสำคัญ การเปลี่ยนแปลงของคาร์โบไฮเดรตในภาวะเค็มของข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์เป็นผลมาจากการควบคุมปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate ในใบข้าว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การศึกษาชีววิทยาระดับโมเลกุลของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase*

ยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* ในข้าวเหลืองประทิว123 และข้าวเหลืองประทิว123-TC171 มีจำนวน 2 ชุดในจีโนม จากผลการศึกษาศาสตร์สามารถตรวจพบสัญญาณการแสดงออกของยีนพบว่ายีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* ในข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์มีรูปแบบการแสดงออกคล้ายคลึงกัน โดยการให้ภาวะเค็มสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนได้เพียงช่วงเริ่มต้น จากนั้นการแสดงออกจะลดต่ำลง โดยยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* ในข้าวเหลืองประทิว123-TC171 มีการตอบสนองต่อภาวะเค็มได้รวดเร็วกว่าโดยมีสัญญาณการแสดงออกสูงสุดภายหลังจากการให้ภาวะเค็มเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ในขณะที่ข้าวเหลืองประทิว123 มีสัญญาณการแสดงออกสูงสุดเมื่อให้ภาวะเค็มไปแล้วเวลา 24 ชั่วโมง

4. ผลของภาวะเค็มต่อกิจกรรมของเอนไซม์ *6-phosphofructo-2-kinase* เอนไซม์ *fructose 2,6-bisphosphatase* และ ปริมาณ *fructose-2,6-bisphosphate*

ภาวะเค็มกระตุ้นให้กิจกรรมของเอนไซม์ *6-phosphofructo-2-kinase* และ เอนไซม์ *fructose 2,6-bisphosphatase* เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามอัตราส่วนระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* ของข้าวเหลืองประทิว123-TC171 มีแนวโน้มลดต่ำลงมากกว่าข้าวเหลืองประทิว123 ทำให้ปริมาณของ *fructose 2,6-bisphosphate* ในข้าวเหลืองประทิว123-TC171 ลดต่ำลงเมื่อข้าวอยู่ในภาวะเค็ม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะ

1. การตอบสนองของยีน *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase* จากการให้ภาวะเค็ม เกิดอย่างรวดเร็วตั้งนั้นในการศึกษาการแสดงออกของยีนจึงควรพิจารณาช่วงเวลาเริ่มต้นของการให้ภาวะเค็มอย่างละเอียด
2. ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้นในภาวะเค็มซึ่งเป็นผลจากปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate ภายในเซลล์แล้ว อาจเป็นผลจากปัจจัยอื่นร่วมด้วย เช่น กิจกรรมของเอนไซม์ sucrose-phosphate synthase จึงควรมีการศึกษาควบคู่กันไป
3. เนื่องจากการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ fructose 6-phosphate,2-kinase และเอนไซม์ fructose 2,6-bisphosphatase ซึ่งมีความสำคัญต่อปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate ในเซลล์ในภาวะเค็มยังไม่ทราบกระบวนการควบคุมที่แน่ชัด เป็นสิ่งที่น่าสนใจต่อการศึกษาในขั้นต่อไป

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- ธนะกาญจน์ มัญชุพาทนี. 2543. การสะสมโพรลีน และการแสดงออกของยีน Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase ในข้าว *Oryza sativa* L. สายพันธุ์ทนเค็มเมื่อได้รับภาวะเค็ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พงศธร กล่อมสกุล. 2547. ผลของกรดแอบไซซิกจากภายนอกที่มีต่อการเติบโต การสะสมโพรลีน และการแสดงออกของยีน Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase ในข้าว *Oryza sativa* L. เมื่ออยู่ในภาวะเค็มและภาวะแล้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วรัญญา คำปัน. 2541. ปริมาณโพรลีนและน้ำตาลเมื่อข้าวอยู่ในภาวะแล้ง และการคัดเลือกข้าวทนแล้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สมพร มณีประสพสุข. 2547. การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในข้าว *Oryza sativa* L. พันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์ทนเค็มในภาวะเค็ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search program. Nucleic Acids Research 25: 3389-3402.
- Banzai, T., Hanagata, N., Dubinsky, Z. and Karuba, I. 2003. Fructose 2,6-bisphosphate contents were increased in response to salt, water and osmotic stress in leaves of *Bruguiera gymnorhiza* by differential changes in the activity of bifunctional enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphate 2-phosphatase. Plant Molecular Biology 53: 51-59.
- Broetto, F., Luttge, U. and Ratajczak, R. 2002. Influence of light intensity and salt-treatment on mode of photosynthesis and enzymes of the antioxidative response system of *Mesembryanthemum crystallinum*. Functional Plant Biology 29(1) : 13-23.
- Cockburn, W., Baldry, C.W. and Walker, D.A. 1967. Some effects of inorganic phosphate on O₂ evolution by isolated chloroplasts. Biochemica et Biophysica Acta 143: 614-624.
- Copeland, L. and Priess, J. 1981. Purification of spinach leaf ADPglucose pyrophosphorylase. Plant Physiology 68: 996-1001.
- Draborg, H., Villadsen, D. and Nielsen, T.H. 1999. Cloning, characterization and expression of a bifunctional fructose-6-phosphate, 2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from potato. Plant Molecular Biology 39: 709-720.
- Furumoto, T., Teramoto, M., Inada, N., Ito, M., Nishida, I. and Watanaba, A. 2001. Phosphorylation of a bifunctional enzyme, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase, is regulated physiologically and developmentally in rosette leaves of *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiology 42(10): 1044-1048.
- Garcia, A.B., de Almeida Engler, J., Iyer, S., Gerats, T., Van Montagu, M. and Caplan, A.B. 1997. Effects of osmoprotectants upon NaCl stress in rice. Plant Physiology 115: 159-169.

- Geigenberger, P., Reimholz, R., Geiger, M., Merlo, L., Canale, V. and Stitt, M. 1997. Regulation of sucrose and starch in potato tubers in response in short-term water deficit. Planta 201: 502-518.
- Greenway, H. and Munns, R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. Annual Review of Plant Physiology 31: 149-190.
- Handel, E.V. 1968. Direct microdetermination of sucrose. Analytical Biochemistry 22: 280-283.
- Hare, P.D., Cress, W.A. and Van Staden, J. 1998. Dissecting roles of osmolyte accumulation during stress. Plant Cell and Environment 21: 535-563.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K. and Bohnert, H.J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 51: 463-499.
- Hernandez, J., Campillo, A., Jimenez, A., Alarcon, J.J. and Servilla, F. 1999. Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants. New Phytologist 141: 241-251.
- Irigoyen, J.J., Emerich, D.W. and Sanchez-Diaz, M. 1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugar in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. Physiologia Plantarum 84: 55-60.
- Kawasaki, S., Borchert, C., Devholos, M., Wang, H., Brazille, S., Kawai, K., Galbraith, D. and Bohnert, H.J. 2001. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. The Plant Cell 13: 889-905.
- Kulma, A., Villadsen, D., Campbell, D.G., Meek, S.E., Harthill, J.E., Nielsen, T.H. and MacKintosh, C. 2004. Phosphorylation and 14-3-3 binding of Arabidopsis 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase. The Plant Journal 37: 654-667.
- Laporte, M.M., Galagan, J.A., Shapiro, J.A., Boersig, M.R., Shewmaker, C.K. and Sharkey, T.D. 1997. Sucrose-phosphate synthase activity and yield analysis of tomato plants transformed with maize sucrose phosphate synthase. Planta 203: 253-259.

- Leegood, R.C. 1999. Photosynthesis in C3 plants: The Benson-Calvin cycle and photosynthesis. In Lea, P.J. and Leegood, R.C. (eds.), Plant Biochemistry and Molecular Biology. Sussex: John Wiley and Sons.
- Nielsen, T.H., Rung, J.H. and Villadsen, D. 2004. Fructose 2,6-bisphosphate: a traffic signal in plant metabolism. Trends in Plant Science 9: 556-563.
- Neumann, P. 1997. Salinity resistance and plant growth revisited. Plant Cell and Environment 20: 1193-1198.
- Mansour, M.M.F. and Salama, K.H.A. 2004. Cellular basis of salinity tolerance in plants. Environmental and Experimental Botany 52: 113-122.
- Matínez, J.P., Jutts, S., Schanck, A., Bajji, M. and Kinet, J.M. 2004. Is osmotic adjustment required for water stress resistance in the Mediterranean shrub *Atriplex halimus* L. Journal of Plant Physiology 161: 1041-1051.
- Micallef, B.J., Haskins, K.A., Vanderveer, P.J., Roh, K.S., Shewmaker, C.K. and Sharkey, T.D. 1995. Altered photosynthesis, flowering and fruiting in transgenic tomato plants that have increased capacity for sucrose synthesis. Planta 196: 327-334.
- Mishra, S.K., Subrahmanyam, D. and Singhal, G.S. 1991. Interrelationship between salt and light stress on primary processes of photosynthesis. Journal of Plant Physiology 138: 92-96.
- Morales, F., Abadía, A. and Abadía, J. 2006. Photoinhibition and photoprotection under nutrient deficiencies, drought and salinity. In Demmig-Adams, B., Adams, W.W.III and Mattoo, A.K. (eds.), Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation and Environment pp.65-85. Netherlands: Springer.
- Park, S., Cho, M.H., Bhoo, S.H., Jeon, J.S., Kwon, Y.K. and Hahn, T.R. 2007. Altered sucrose synthesis in rice plants with reduced activity of fructose-6-phosphate 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase. Journal of Plant Biology 50(1): 38-43.
- Porra. R.J., Thompson, W.A. and Kriedelmann, P.E. 1989. Determination of accurate extractions and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. Biochimica et Biophysica Acta 975: 384-394.

- Quick, P., Siegl, G., Neuhaus, E., Feil, R. and Stitt, M. 1989. Short-term water stress lead to stimulation of sucrose synthesis by activating sucrose-phosphate synthase. Planta 177: 535-546.
- Reddy, A.R. 1996. Fructose 2,6-bisphosphate-modulated photosynthesis in sorghum leaves grown under low water regimes. Phytochemistry 43(2): 319-322.
- Reddy, A.R., Chaitanya, K.V. and Viveleanandan, M. 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plant. Journal of Plant Physiology 161: 1189-1202.
- Rosa, J.L., Tauler, A., Lange, A.J., Piskis, S.J. and Bartrons, R. 1992. Transcriptional and posttranscriptional regulation of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase during liver generation. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 89: 3746-3750.
- Rose, R., Rose, C.L., Omi, S.K., Forry, K.R., Durall, D.M. and Bigg, W.L. 1991. Starch determination by perchloric acid vs. enzymes: evaluating the accuracy and precision of six colorimetric methods. Journal of Agricultural and Food Chemistry 9: 3-11.
- Sam, O., Ramirez, C., Coronado, M.J., Testillsno, P.S. and Risueno, M.C. 2003. Changes in tomato leaves induced by NaCl stress: leaf organization and cell ultrastructure. Biologia Plantarum 47(3): 361-366.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: A Laboratory Manual 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor.
- Scott, P., Lange, A.J., Piskis, S.J. and Kruger, N.J. 1995. Carbon metabolism in leaves of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) containing elevated fructose 2,6-bisphosphate levels. The Plant Journal 7: 461-469.
- Scott, P., Lange, A.J., and Kruger, N.J. 2000. Photosynthetic carbon metabolism in leaves of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) containing decreased amounts of fructose 2,6-bisphosphate. Planta 211: 864-873.

- Serrano, R. and Gaxiola, R. 1994. Microbial models and salt stress tolerance in plants. Critical Review in Plant Science 13: 121-138.
- Sibole, J.V., Montero, E., Cabot, C., Poschenrieder, C. and Barceló, J. 1998. Role of sodium in the ABA-mediated long-term growth response of bean to salt stress. Physiologia Plantarum 104: 299-305.
- Stitt, M., Hernd, H. and Heldt, H.W. 1984. Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose 2,6-bisphosphate I : coordination of CO₂ fixation and sucrose synthesis. Plant Physiology 75: 548-553.
- Stitt, M. 1990 a. Fructose 2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. Annul Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 41: 153-185.
- Stitt, M. 1990 b. The flux of carbon between the chloroplast and cytoplasm. In Dennis, D.T. and Turpin, D.H.(eds.), Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology p 309-326. Singapore: Longman Scientific & Technical.
- Street, T.O., Bolen, D.W. and Rose, G.D. 2006. A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 103(38): 13997-14002.
- Sudhir, P. and Murthy, S.D.S. 2004. Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. Photosynthetica 42(4): 481-486.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 2006. Plant Physiology. 4th ed. Massachusetts: Sinaure Associate.
- Thikart, P., Kowanij, D., Selanan, T., Vajrabhaya, M., Bangyeekhun, T. and Chadchawan, S. 2005. Genetic variation and stress tolerance of somaclonal variegated rice and its original cultivar. Journal of Science Research Chulalongkorn University 30: 63-75.
- Trevanion, S.J. 2000. Photosynthetic carbohydrate metabolism in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves: optimization methods for determination of fructose 2,6-bisphosphate. Journal of Experimental Botany 51: 1037-1045.
- Vajrabhaya, M. and Vajrabhaya, T. 1991. Somaclonal variation of salt tolerance in rice. In Y.P.S. Bajaj. (ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry. Berlin Heidelberg: Springer-Valege. pp. 368-382.

- Vassey, T.L. and Sharkey, T.D. 1989. Mild stress of *Phaseolus vulgaris* plants leads to reduced starch synthesis and extractable sucrose phosphate synthase activity. Plant Physiology 89: 1066-1070.
- Villadsen, D., Rung, J.H., Draborg, H. and Neilsen, T.H. 2000. Structure and heterologous expression of a gene encoding fructose-6-phosphate,2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from *Arabidopsis thaliana*. Biochimica et Biophysica Acta 1492: 406-413.
- Villadsen, D. and Neilsen, T.H. 2001. N-terminal truncation affects the kinetics and structure of fructose-6-phosphate,2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from *Arabidopsis thaliana*. Biochemistry Journal 359: 591-597.
- Winter, H. and Huber, S.C. 2000. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzyme. Critical Reviews in Plant Sciences 19(1): 31-67.
- Xiong, L. and Zhu, J.K. 2002. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. Plant Cell and Environment 25: 313-319.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก ก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 (Vajrabhaya และ Vajrabhaya, 1991)

ชื่อสารเคมี	ปริมาณสาร (mg/L)
Macroelements	580
Potassium nitrate (KNO ₃)	500
Calcium sulfate (CaSO ₄)	450
Magnesium sulfate (MgSO ₄ •7H ₂ O)	250
Triple super phosphate ()	100
Ammonium sulfate ((NH ₄) ₂ SO ₄)	
Microelements	
Di-sodium ethylene diamine tetraacetate (Na ₂ EDTA) ^a	160
Ferrous sulfate (FeSO ₄ •7H ₂ O)	120
Manganese Sulfate (MnSO ₄ •H ₂ O)	15
Boric acid (H ₃ BO ₃)	5
Zinc sulfate (ZnSO ₄ •7H ₂ O)	1.5
Potassium iodine (KI)	1.0
Potassium molybdate (Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O)	0.1
Copper sulfate (CuSO ₄ •5H ₂ O)	0.05
Cobalt chloride (CoCl ₂ •6H ₂ O)	0.05

^a การเตรียม FeSO₄ stock ความเข้มข้น 30 g/L

1. ชั่ง Na₂EDTA 40 กรัม และ FeSO₄•7H₂O 30 กรัม
2. แยกละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 70-90 องศาเซลเซียส
3. ผสมสารละลายทั้งสองให้เข้ากัน จากนั้นพ่นพองอากาศเป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง จนกระทั่งได้สารละลายใส

2. สารละลายที่ใช้ในการทดลอง

สารละลาย	ส่วนประกอบ
10X MOPS	0.2 M MOPS 80 mM sodium acetate 10 mM EDTA
20X SSC	3 M NaCl 0.3 M sodium acetate
5X TBE	54 g Tris-base 27.5 g boric acid 20 ml 0.5 M EDTA pH 8.0
Anthrone	76 ml concentrated sulfuric acid 36 ml distilled water 150 mg anthrone
DNA extraction buffer	100 mM Tris pH 8.0 1.4 M NaCl 20 mM EDTA 4%(W/V) CTAB 0.1%(V/V) β -mercaptoethanol
DEPC-treated TE	10 mM Tris pH8.0 1 mM EDTA 0.1%(V/V) DEPC (diethyl pyrrocarbonate)
Detection buffer	0.1 M Tris-HCl 0.1 M NaCl
DNA loading dye and RNA loading dye for agarose gel	30% glycerol in water 0.25% bromophenol blue 0.25% xylene cyanol

Enzyme extraction buffer	50 mM MOPS-KOH pH 7.3 10%(V/V) ethylene glycol 5 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA 0.1%(V/V) β-mercaptoethanol 0.1%(V/V) triton X-100 5 mM benzamidine 2mM phenylmethylsulfonyl fluoride 3mg/l leupeptine 3mg/l antipain
Formaldehyde gel	1.5 g agarose ใน DEPC-treated water 15 ml 37% formaldehyde 12 ml 10XMOPS
LB agar medium	1%bacto-tryptone 0.5%bacto-yeast extract 1%NaCl 1.5% LB agar
LB medium	1%bacto-tryptone 0.5%bacto-yeast extract 1%NaCl
Maleic acid buffer	0.1 M maleic acid 0.15 M NaCl ปรับ pH ให้เป็น 7.5 ด้วย NaOH
RNA extraction buffer	100 mM Tris pH 9.0 100 mM NaCl 20 mM EDTA 1% lauryl sarcosinate 0.1%(V/V) β-mercaptoethanol 0.1%(V/V) DEPC (diethyl pyrrocarbonate)

RNA loading dye for formaldehyde gel (1.5 ml)	80% glycerol	100 μ l
	formamide	720 μ l
	formaldehyde	260 μ l
	10X MOPS	160 μ l
	DEPC-treated water	180 μ l
	bromophenol blue (saturated)	80 μ l
Solution I	50 mM glucose 25 mM Tris-HCl 10 mM EDTA	
Solution II	0.1N NaOH 1% SDS	
Solution III	5 M Potassium acetate Glacial acetic acid	
TE	10 mM Tris pH8.0 1 mM EDTA	
Washing buffer	0.2 M maleic acid 0.15 M NaCl 0.3%(V/V) tween 20	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก ข

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. วิธีการสกัดและวิเคราะห์น้ำตาล (Irigoyen และคณะ, 1992) และซูโครส (Handel, 1968)

- 1.1 บดตัวอย่างใบข้าว ด้วย 80%ethanol ปริมาตร 25 มิลลิลิตรจนละเอียด จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
- 1.2 ดูดเก็บสารละลายใส แล้วนำกากมาสกัดซ้ำด้วย 80%ethanol ปริมาตร 25 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
- 1.3 ปรับปริมาตรของสารละลายให้เป็น 50 มิลลิลิตร ด้วย volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 1.4 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลจากการแบ่งสารละลาย 0.1 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย anthrone ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่ในน้ำแข็ง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง
- 1.5 วิเคราะห์ปริมาณซูโครสจากการแบ่งสารละลาย 0.1 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย anthrone ปริมาตร 3 มิลลิลิตร โดยการนำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่ในน้ำแข็ง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง
- 1.6 นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

2. วิธีการสกัดและวิเคราะห์แป้ง (Rose และคณะ, 1991)

- 2.1 นำกากพืชที่สกัดน้ำตาลจนหมด (ข้อ1.2) ผสมกับ 35% perchoric acid ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เทสารละลายทั้งหมดลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าเป็นเวลา 15 นาที
- 2.2 ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
- 2.3 เก็บสารละลายใส แล้วนำกากมาสกัดซ้ำด้วย 35% perchoric acid ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 15 นาที

- 2.4 ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
- 2.5 เก็บสารละลายใส ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 50 มิลลิลิตร ด้วย 35% perchoric acid ใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 2.6 วิเคราะห์ปริมาณแอมป์จากการแบ่งสารละลาย 0.1 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย anthrone ปริมาตร 3 มิลลิลิตร โดยการนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่ในน้ำแข็ง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง
- 2.7 นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

3. วิธีการสกัด DNA ด้วยวิธีการดัดแปลงจาก CTAB ของ Thikart และคณะ (2005)

- 3.1 บดตัวอย่างใบข้าว ด้วยไนโตรเจนเหลว จนละเอียด ในโถรงบที่ฆ่าเชื้อ
- 3.2 เติม CTAB buffer 5 มิลลิลิตร ซึ่งอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ผสมให้เข้ากัน เทส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอดปริมาตร 15 มิลลิลิตร
- 3.3 Incubate ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
- 3.4 เติม chloroform ด้วยปริมาตรที่เท่ากับสารละลายในหลอด กลับหลอดไปมา เพื่อให้สารละลายเข้ากันดี
- 3.5 ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 3.6 ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ สกัดซ้ำด้วย phenol-chloroform ปริมาตรเท่ากับสารละลายที่อยู่ในหลอด
- 3.7 ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 3.8 ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่เติม isopropanol ที่แช่เย็น ปริมาตรสองเท่าของสารละลายที่อยู่ในหลอด กลับหลอดไปมา เพื่อให้สารละลายเข้ากันดี
- 3.9 ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายออกแล้วล้างด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

- 3.10 ทิ้งให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นละลายตะกอนด้วย TE buffer
- 3.11 วัดค่าความเข้มข้นของ DNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง ที่ค่าความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

4. วิธีการสกัด RNA โดยวิธี hot phenol ของ Thikart และคณะ (2005)

- 4.1 บดตัวอย่างใบข้าว 0.1 กรัม ด้วยไนโตรเจนเหลว ในโถรงบดที่ผ่านการทำลาย RNase แล้วจากนั้นตัดตัวอย่างใส่หลอด microcentrifuge ที่ทำให้เย็นจัดด้วยไนโตรเจนเหลว
- 4.2 เเท extraction buffer และ phenol: chloroform (1:1) อย่างละ 600 μ l ซึ่งอุ่นให้ร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เขย่าแล้วแช่ลงในน้ำแข็งทันที
- 4.3 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีแยกสารละลายใสนำมาสกัดซ้ำด้วย phenol: chloroform (1:1) อีกครั้งหนึ่ง โดยใช้ปริมาตรเท่ากับสารละลายในหลอด
- 4.4 ดูดสารละลายชั้นบนใสหลอดใหม่ จากนั้นเติม 100% ethanol ปริมาตรสองเท่าของสารละลายที่ดูดมาได้ กลับหลอดเพื่อให้สารละลายเข้ากันดี จากนั้นนำไปตกตะกอนที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
- 4.5 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 4.6 ล้างตะกอนด้วย 80% ethanol จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ตะกอนแห้งสนิท
- 4.7 ละลายตะกอนด้วย DEPC-treated TE ปริมาตร 160 μ l
- 4.8 เติม 10 M LiCl ปริมาตร 40 μ l กลับหลอดเพื่อให้สารละลายเข้ากันดี จากนั้นนำไปตกตะกอนที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง
- 4.9 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้เพื่อให้ตะกอนแห้ง
- 4.10 ละลายตะกอนด้วย DEPC-treated TE ปริมาตร 20 μ l
- 4.11 วัดความเข้มข้นของสารละลายด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เพื่อปริมาณค่าความเข้มข้นของ RNA

4.12 ตรวจสอบคุณภาพของ RNA ด้วยชุดแยกกรดนิวคลีอิกด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวระนาบ

5. การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate

- 5.1 บดตัวอย่างใบพืชด้วยไนโตรเจนเหลว จนละเอียด ในโถรงบดที่ฆ่าเชื้อ
- 5.2 เติม 50mM KOH ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใช้ที่บดกวนให้เป็นเนื้อเดียว
- 5.3 คุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นวางหลอดในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 3 นาที
- 5.4 เติม activated charcoal 0.01 กรัม เขย่าเพื่อให้เข้ากัน จากนั้นวางบนน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 15 นาที
- 5.5 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดเก็บสารละลายใส่ส่วนบนไว้เพื่อการวิเคราะห์หาปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate
- 5.6 วิเคราะห์ปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate ด้วยการติดตามการเปลี่ยนแปลงอัตราของปฏิกิริยาเอนไซม์ pyrophosphate fructose 6-phosphate phosphotransferase (EC 2.7.1.90) ด้วยปฏิกิริยาดังนี้

50 mM Tris-HCl

2 mM MgCl₂

1.5 mM NADH

1 mM fructose-6-phosphate

0.1 U aldolase (EC 4.1.2.13)

1 U triose-phosphate isomerase (EC 5.3.1.1)

0.1 U glycerol-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.99.5)

2 mU pyrophosphate fructose 6-phosphate

phosphotransferase (EC 2.7.1.90)

0.5 mM Na₄PPi

2 μl สารสกัด

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ทุกๆนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

5.7 สร้างกราฟมาตรฐานโดยการย่อย fructose 2,6-bisphosphate ในสารสกัดด้วย 250 mM HCl เป็นเวลา 15 นาทีจากนั้นเติม 250 mM KOH ปริมาตรเท่ากันลงไป เติม fructose 2,6-bisphosphate ปริมาณต่างๆลงไป (0-1 pmole) วิเคราะห์ปริมาณ fructose 2,6-bisphosphate ด้วยการติดตามการเปลี่ยนแปลงอัตราของปฏิกิริยาเอนไซม์ pyrophosphate fructose 6-phosphate phosphotransferase ตามปฏิกิริยาข้อ 5.6

6. การสกัดและศึกษาการทำงานของเอนไซม์ 6-phosphofructo-2-kinase และเอนไซม์ fructose 2,6-bisphosphatase

- 6.1 บดตัวอย่างใบพืชด้วยไนโตรเจนเหลว จนละเอียด ในโถรงบดที่ฆ่าเชื้อ
- 6.2 เติม extraction buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บดให้เป็นเนื้อเดียวกัน
- 6.3 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 6.4 เก็บสารละลายใสส่วนบน เพื่อกรองผ่าน sephadex G-25 ที่แช่ใน reaction buffer ก่อนแล้ว
- 6.5 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเก็บสารละลายที่ผ่านการกรองเพื่อทำการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ 6-phosphofructo-2-kinase และเอนไซม์ fructose 2,6-bisphosphatase ต่อไป
- 6.6 วิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ 6-phosphofructo-2-kinase ด้วยปฏิกิริยา
- 50 mM MOPS-KOH pH 7.3
10% (V/V) ethylene glycol
7.5 mM MgCl₂
1 mM EDTA
5 mM KH₂PO₄
15 mM fructose 6-phosphate
20 mM glucose 6-phosphate
2.5 mM ATP
10 µl ของสารสกัด

หลังจากผ่านไป 10 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 100 mM KOH ปริมาตรเท่ากัน วัดการเกิด fructose 2,6-bisphosphate ตามกระบวนการในข้อ 5.6-5.9 นิยาม 1 unit ของเอนไซม์ 6-phosphofructo-2-kinase จากความสามารถในการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้น 1pmole ในเวลา 1 นาที

6.6 วิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ fructose 2,6-bisphosphatase

50 mM MOPS-KOH pH 7.3

10% (V/V) ethylene glycol

1 mM EDTA

30 μ mole fructose 2,6-bisphosphate

10 μ l ของสารสกัด

หลังจากผ่านไป 10 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 100 mM KOH ปริมาตรเท่ากัน วัดการเกิด fructose 2,6-bisphosphate ตามกระบวนการในข้อ 5.6-5.9 นิยาม 1 unit ของเอนไซม์ fructose 2,6-bisphosphatase จากความสามารถในการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้น 1pmole ในเวลา 1 นาที

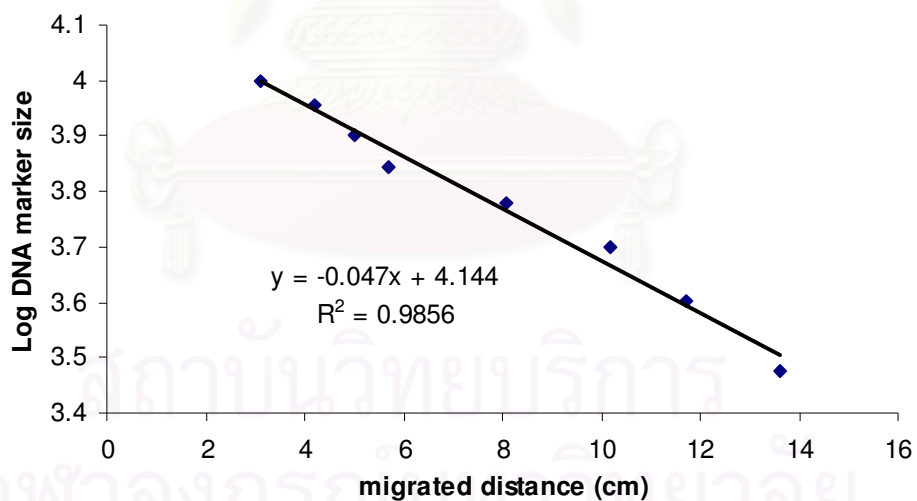
7. การปลูกข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 สายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) เก็บเมล็ดเพื่อเป็นการรักษาสายพันธุ์

เพาะเมล็ดบนทรายเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นย้ายปลูกลงในขวดแก้วขนาด 100 มิลลิลิตร ที่ภายในมีสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP no.2 (Vajrabhaya และ Vajrabhaya, 1991) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยบรรจุขวดละ 20 ต้น หลังจากนั้น 1 สัปดาห์เปลี่ยนสารละลายธาตุอาหารมาเป็นสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลงที่มี โซเดียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนสารละลายธาตุอาหาร ทุกๆสัปดาห์ และทำการเติมน้ำเพื่อรักษาระดับของสารละลายธาตุอาหารให้คงที่ทุกวัน ตลอดเวลาของการทดลอง เมื่อครบ 4 สัปดาห์ของการให้ภาวะเค็ม ให้ทำการ rewater อีกเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นคัดเลือกต้นกล้าข้าวที่รอดตายและแข็งแรง นำไปปลูกในกระถางที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร ซึ่งบรรจุดินเหนียวประมาณ 3 ใน 4 ของกระถาง ซึ่งต้องมีการเตรียมดินก่อนที่จะทำการย้ายปลูกต้นกล้า โดยการเติมน้ำลงไปจนเต็มกระถางเป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นเติมปุ๋ย 16-16-16 ลงไปในกระถางก่อนทำการย้ายปลูกต้นกล้าข้าว 1-2 วันเมื่อย้ายปลูกข้าวลงไป ในกระถางแล้วรดน้ำให้เต็มกระถางทุกวัน และใส่ปุ๋ย 16-16-16 สัปดาห์ละครั้ง รอให้ข้าวแตกกอประมาณ 60-75 วันหลังจากทำการย้ายปลูก ในระหว่างการปลูกเพื่อเก็บเมล็ด ให้ทำการกำจัดโรค,แมลง และศัตรูพืชตามการระบาดจนกว่าจะเก็บเมล็ด

สำหรับข้าวเหลืองประทิว123 สายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) ซึ่งเป็นข้าวไวแสง จำเป็นต้องคำนวณระยะเวลาให้ต้นข้าวเจริญและแตกกอเต็มทีตามเวลาที่กำหนดข้างต้น จนถึงราวกลางเดือนพฤศจิกายนซึ่งจะเข้าสู่ช่วงวันสั้น เพื่อกระตุ้นให้เกิดตาดอก (flower bud initiation) หลังจากข้าวตั้งท้องและออกรวงเป็นเวลาประมาณ 1.5-2 เดือน ทำการรดน้ำเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วจึงทำการเก็บเมล็ด โดยตัดรวงที่มีเมล็ดแก่จัดแล้วนำไปตากแดดให้แห้ง จากนั้นนำไปเก็บในตู้เย็นเป็นเวลา 1 ฤดูกาลปลูก สำหรับรอบการปลูกในรอบต่อไป

8. การหาขนาด DNA จาก DNA marker

DNA marker size(base)	migrated distance (cm)	Log ₁₀ DNA marker
10000	3.1	4
9000	4.2	3.954243
8000	5	3.90309
7000	5.7	3.845098
6000	8.1	3.778151
5000	10.2	3.69897
4000	11.7	3.60206
3000	13.6	3.477121

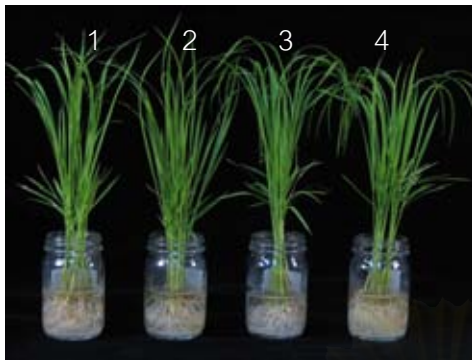


ตัวอย่างกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาขนาดของ DNA marker

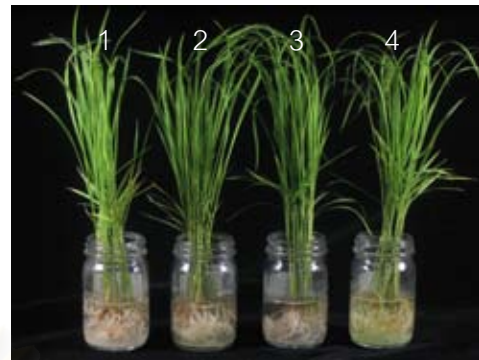


ภาคผนวก ค

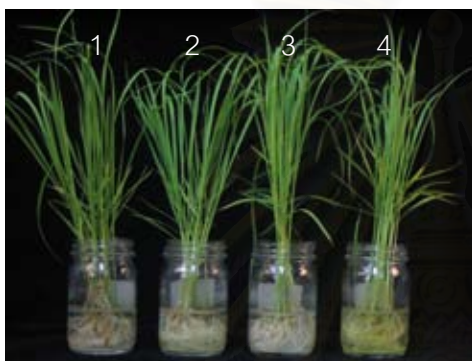
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



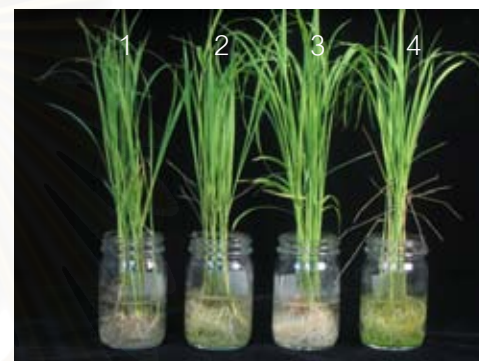
0 ชั่วโมง



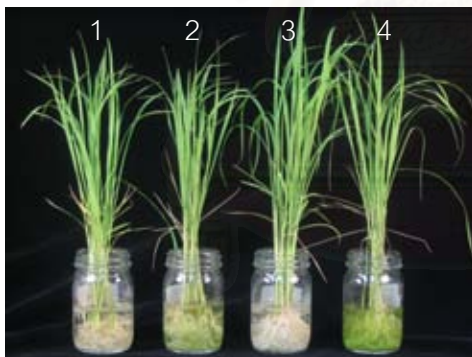
12 ชั่วโมง



24 ชั่วโมง



48 ชั่วโมง



72 ชั่วโมง

รูปที่ 16 ข้าวเหลืองประทิว123 และ ข้าวเหลืองประทิว123-TC171 เมื่อปลูกเลี้ยงใน สารละลายธาตุอาหารสูตร WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5% (W/V) โดยที่

1. = ข้าวเหลืองประทิว123 ในสารละลายธาตุอาหาร WP
2. = ข้าวเหลืองประทิว123 ในสารละลายธาตุอาหาร WP+0.5%NaCl
3. = ข้าวเหลืองประทิว123-TC171 ในสารละลายธาตุอาหาร WP
4. = ข้าวเหลืองประทิว123-TC171 ในสารละลายธาตุอาหาร WP+0.5%NaCl



ภาคผนวก ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน Os_D1_B15_5 (สมพร มณีประสพสุข, 2547)

GGAGGGTGTGGGAATAACGTAATGCTCCAAGTCAAGCTCCAACTTTTCAGTAGATGTA
 TCCTCGGTCCCATGCGCAGGTGCGACATTTATACTGACATCAGGGATTCCCCGGACTT
 TGAAGGCTGAAAATTCTCCTTGAACACCCTCCA

2. การตัด genomic DNA ในโครโมโซมแท่งที่ 5 ของข้าวในบริเวณยีน 6
 phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ
*Bam*HI, *Eco*RI and *Hind*III (NEBCutter2, <http://tools.neb.com/>)



สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวธนิภานต์ อุดมชโลทร เกิดเมื่อวันที่ 10 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2525 ที่จังหวัด สุราษฎร์ธานี สำเร็จการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง สาขา ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ในปีการศึกษา 2546 จากนั้นเข้าศึกษา ต่อในระดับปริญญาโท สาขาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547 โดยได้รับทุนการศึกษาจากโครงการพัฒนาและ ส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) ในระดับปริญญาบัณฑิต และปริญญาโท



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย