

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายย่อ	(8)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
ยูคาลิปตัส ความลาดดูเลนซิส	4
ดินเค็มและการแพร่กระจายดินเค็ม	4
ผลกระทบของเกลือต่อพืช	6
ความสามารถในการทนเค็มของพืช	7
การปรับออสโมติก	7
การจัดเก็บโซเดียม	10
กลไกลดความเป็นพิษของ Reactive Oxygen Species (ROS)	11
การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนและโปรตีนเมื่อเกิดสภาวะเครียดจากเกลือ	13
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	15
คัดเลือกยูคาลิปโตทนเค็มและอ่อนแอต่อสภาวะเครียดจากโซเดียมคลอไรด์	15
การศึกษาการแสดงออกของยีนและโปรตีนภายใต้สภาวะเครียดจากโซเดียมคลอไรด์	16
สถานที่ทำการทดลอง	27
ระยะเวลาในการทดลอง	27
ผลการทดลองและวิจารณ์	28
สรุป	52
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	54
ภาคผนวก	63

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 สารต่าง ๆ ที่มีการสะสมสูงขึ้นในเซลล์เมื่อพืชตอบสนองต่อสภาวะเครียดจากเกลือมีหน้าที่ช่วยในกระบวนการทนเค็มในพืช	9
2 Compatible solute ที่สะสมในเซลล์พืชเมื่อสภาวะขาดน้ำและสภาวะเครียดจากเกลือ	10
3 ปฏิกริยาการเชื่อมต่อ DNA กับพลาสติก ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง	20
4 Primer ที่ใช้ในการเพิ่มชิ้นส่วนของยีน Cu/Zn SOD และ APX ในยูคาลิปตัส	38
5 ลำดับกรดอะมิโนของโพลีเปปไทด์ ขนาด 28 kDa จากใบยูคาลิปตัสโคลน C4 ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 100 mM	50
6 ลำดับกรดอะมิโนของโพลีเปปไทด์ขนาด 70 kDa จากใบยูคาลิปตัสโคลน C4 ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 100 mM	50

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
1 มวลสดและมวลแห้งของยูคาลิปตัส โคลน C1, C2, C3, C4, C5 และ C6 หลังจากเลี้ยงในสารละลายธาตุอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0 (control), 100 และ 200 mM เป็นเวลา 14 และ 28 วัน หลังจากย้ายปลูก	64
2 เปอร์เซนต์การอยู่รอดของยูคาลิปตัส โคลน C1, C2, C3, C4, C5 และ C6 หลังจากเลี้ยงในสารละลายธาตุอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0 (control), 100 และ 200 mM เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน หลังจากย้ายปลูก	66
3 มวลสดและมวลแห้งของยูคาลิปตัส โคลน C1, C4 และ C6 หลังจากเลี้ยงในสารละลายธาตุอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0 (control), 100 และ 200 mM เป็นเวลา 7, 14 และ 21 วัน หลังจากย้ายปลูก	68
4 เปอร์เซนต์การอยู่รอดของยูคาลิปตัส โคลน C1, C4 และ C6 หลังจากเลี้ยงในสารละลายธาตุอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0 (control), 100 และ 200 mM เป็นเวลา 7, 14 และ 21 วัน หลังจากย้ายปลูก	69
5 อัตราการเจริญเติบโตของยูคาลิปตัส โคลน C1, C4 และ C6 เมื่อได้รับโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0 (control), 100 และ 200 mM	70
6 การเตรียม competent cell	71
7 สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย	72

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กลไกลดความเป็นพิษของ Reactive oxygen species (ROS) ใน คลอโรพลาสต์	13
2	Promoter และ Multiple Cloning Sequence ของ pGEM®-T Easy Vectors (A) และ pGEM®-T Easy Vector Circle Maps (B)	21
3	a) ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อมวลสด b) ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อมวล แห้ง c) การกระจายมวลแห้งของยูคาลิปตัส ในแต่ละโคลน (C1, C2, C3, C4, C5 และ C6) ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เมื่อ 0 = 0 mM (control), 100 = 100 mM และ 200 = 200 mM เป็นเวลา 14 วัน หลังจากย้ายปลูก	30
4	a) ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อมวลสด b) ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อมวล แห้ง c) การกระจายมวลแห้งของยูคาลิปตัส ในแต่ละโคลน (C1, C2, C3, C4, C5 และ C6) ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เมื่อ 0 = 0 mM (control), 100 = 100 mM และ 200 = 200 mM เป็นเวลา 28 วัน หลังจากย้ายปลูก	31
5	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของยูคาลิปตัส ในแต่ละโคลน (C1, C2, C3, C4, C5 และ 6) ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ เมื่อ 0 = 0 mM (control), 100 = 100 mM และ 200 = 200 mM เป็นเวลา 7 วัน (a), 14 วัน (b), 21 วัน (c) และ 28 วัน (d) หลังจากย้ายปลูก	32
6	a) ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อมวลสด b) ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อมวล แห้ง c) การกระจายมวลแห้งของยูคาลิปตัส ในแต่ละโคลน (C1, C4 และ C6) ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ เมื่อ 0 = 0 mM (control), 100 = 100 mM และ 200 = 200 mM เป็นเวลา 7 วัน หลังจากย้าย ปลูก	34
7	a) ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อมวลสด b) ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อมวล แห้ง c) การกระจายมวลแห้งของยูคาลิปตัส ในแต่ละโคลน (C1, C4 และ C6) ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ เมื่อ 0 = 0 mM (control), 100 = 100 mM และ 200 = 200 mM เป็นเวลา 14 วัน หลังจาก ย้ายปลูก	35

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
8	a) ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อมวลสด b) ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อมวลแห้ง c) การกระจายมวลแห้งของยูคาลิปตัสในแต่ละโคลน (C1, C2 และ C3) ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ เมื่อ 0 = 0 mM (control), 100 = 100 mM และ 200 = 200 mM เป็นเวลา 21 วัน หลังจากย้ายปลูก	36
9	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของยูคาลิปตัสในแต่ละโคลน (C1, C4 และ C6) ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ เมื่อ 0 = 0 mM (control), 100 = 100 mM และ 200 = 200 mM เป็นเวลา 7 วัน (a) 14 วัน (b) และ 21 วัน (c) หลังจากย้ายปลูก	37
10	แถบชิ้นส่วนของยีน Cu/Zn SOD ขนาดประมาณ 400 คู่เบส (lane 1) และ ยีน APX ขนาดประมาณ 700 คู่เบส (lane 2) ที่ได้จากการสังเคราะห์ cDNA จาก RNA ของใบยูคาลิปตัส โดยใช้ primer S1, S2 และ A1, A2 ตามลำดับ M คือ DNA ขนาดมาตรฐานขนาดต่างกัน 100 คู่เบส	39
11	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนของยีน Cu/Zn SOD จากยูคาลิปตัส ขนาด 390 คู่เบส โดยใช้ไพรเมอร์ S1 และ S2	40
12	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนของยีน APX จากยูคาลิปตัส ขนาด 684 คู่เบส โดยใช้ไพรเมอร์ A1 และ A2	41
13	การวิเคราะห์ multiple alignments ระหว่างลำดับเบสของยีน Cu/Zn SOD ในยูคาลิปตัส กับลำดับเบสของยีน Cu/Zn SOD ในพืชชนิดอื่น	42
14	การวิเคราะห์ multiple alignments ระหว่างลำดับเบสของยีน APX ในยูคาลิปตัส กับลำดับเบสของยีน APX ในพืชชนิดอื่น	43
15	การแสดงออกของยีน Cu/Zn SOD และ APX ของใบยูคาลิปตัส ทั้ง 3 โคลน (C1, C4 และ C5) หลังจากให้โซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ เมื่อ 0 = 0 mM (Control), 100 = 100 mM และ 200 = 200 mM เป็นเวลา 21 วัน หลังจากย้ายปลูก	45

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	รูปแบบของโปรตีน โดยการทำ SDS-PAGE ในไบยูลาลิปดัสทั้ง 3 โคลน (C1, C4 และ C6) ที่ได้รับไซโตไคนมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อ 0 = 0 mM (control), 100 = 100 mM และ 200 = 200 mM และ ตำแหน่ง โพลีเปปไทด์ ขนาดประมาณ 28 และ 70 kDa ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น หลังจากได้รับไซโตไคนมคลอไรด์เป็นเวลา 21 วัน หลังย้ายปลูก	47
17	ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนขนาดประมาณ 28 kDa (ตัวอักษรสีแดง) ที่ เหมือนกับลำดับกรดอะมิโน ในฐานข้อมูล gi60460816: ATP synthase CF1 beta subunit	51
18	ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนขนาดประมาณ 70 kDa (ตัวอักษรสีแดง) ที่ เหมือนกับลำดับ กรดอะมิโน ในฐานข้อมูล gi 224970: heat shock protein 70 (HSP70)	51

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่

หน้า

- 1 ลักษณะอาการของยูคาลิปตัสโคลน C1 (a), C4 (b) และ C5 (c) หลังจากเลี้ยงในสารละลายธาตุอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ 0 (Control), 100 และ 200 mM เป็นเวลา 21 วันหลังจากย้ายปลูก

73

คำอธิบายคำย่อ

คำย่อ	คำอธิบาย
APX	Ascorbate peroxidase
CaCl ₂	Calcium Chloride
Cu/Zn SOD	Copper/Zinc Superoxide dismutase
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
g	กรัม
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside
kb	กิโลเบส
KCl	Potassium Chloride
kDa	กิโลดาลตัน
LiCl	Lithium Chloride
MgCl ₂	Magnesium Chloride
mM	มิลลิโมลาร์
MnCl ₂	Manganese Chloride
Na ₂ HPO ₄	Sodium Hydrogen Phosphate Dodecahydrate
NaCl	Sodium Chloride
NaH ₂ PO ₄	Sodium Phosphate Monobasic
NaOAc	Sodium Acetate
NaOH	Sodium Hydroxide
ng	นาโนกรัม
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
β-Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol
Tris-HCL	Tris-Base ปรับ pH ด้วย HCl
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β-D-Galactopyranoside