



วิทยานิพนธ์

การตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือของหม่อน

SALT-STRESS RESPONSE OF MULBERRY, *Morus rotunbiloba*

นางสาวเนตรนภา นิ่งกิตติ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

ปริญญา

ชีวเคมี

สาขา

ชีวเคมี

ภาควิชา

เรื่อง การตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือของหม่อน

Salt-Stress Response of Mulberry, *Morus rotundiloba*

นามผู้วิจัย นางสาวเนตรนภา นิ่งกิตติ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อมรรัตน์ พรหมบุญ, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์สุนันทา รัตนโก, Ph.D.)

กรรมการ

(อาจารย์สิทธิรักษ์ รอยตระกูล, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์เลิศลักษณ์ เงินศิริ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์สุนันทา รัตนโก, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือของหม่อน

Salt-Stress Response of Mulberry, *Morus rotundiloba*

โดย

นางสาวเนตรนภา นิ่งกิตติ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

พ.ศ. 2551

เนตรนภา ถึงกิตติ 2551: การตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือของหม่อน ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี) สาขาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี ประชานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อมรรรัตน์ พรหมบุญ, Ph.D. 172 หน้า

การศึกษากดึกการตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือของหม่อนพันธุ์พื้นเมืองสายพันธุ์หม่อนน้อย (*Morus rotundiloba* Koidz.) โดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในหม่อนอายุ 3 สัปดาห์ ควบคุมให้ได้รับแสง 16 ชั่วโมงที่ความเข้ม $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ 25°C ความชื้น 70-80 % ทำการชักนำให้เกิดความเครียดโดยการเติมเกลือแกงที่มีความเข้มข้นต่างๆ นาน 7 วัน จากนั้นเก็บตัวอย่างใบและรากที่เวลาต่างๆ มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ น้ำตาล และตรวจสอบการแสดงออกของยีนบางชนิดในระดับทรานสคริปชัน

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ ATPases, glucosidase, glutathione-S-transferase และ peroxidases พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ความเข้มข้นเกลือ 300 และ 500 มิลลิโมลาร์สูงกว่าในชุดควบคุม ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ที่ความเข้มข้นเกลือ 100 และ 600 มิลลิโมลาร์มีค่าใกล้เคียงกับชุดควบคุม กิจกรรมของเอนไซม์ ATPase ในใบและราก เพิ่มขึ้น 3.5 และ 5.5 เท่าตามลำดับที่ความเข้มข้นเกลือ 500 มิลลิโมลาร์ กิจกรรมของเอนไซม์ glucosidase ในใบเพิ่มสูงขึ้น 3 เท่าที่ความเข้มข้นเกลือ 300 และ 500 มิลลิโมลาร์ ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ glutathione-S-transferase ใกล้เคียงกันทั้งในใบและราก มีกิจกรรมเพิ่มสูงขึ้น 3 - 4 เท่าที่ความเข้มข้นเกลือ 300 และ 500 มิลลิโมลาร์ตามลำดับเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และกิจกรรมของเอนไซม์ neutral peroxidase ในใบเพิ่มขึ้น 3.5 เท่าที่ความเข้มข้นเกลือ 300 และ 500 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีค่าสูงกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ acidic และ basic peroxidases

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในใบและรากด้วยเทคนิค HPLC พบน้ำตาลอย่างน้อย 4 ชนิด ได้แก่ ฟรุคโตส กลูโคส แมนนิทอล และซูโครสเพิ่มขึ้นเฉพาะในใบ แต่ไม่พบในราก

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความเครียดบางชนิดด้วย RT-PCR พบว่ายีนเลคตินมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและลดลงเมื่อได้รับเกลือ 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ในขณะที่ยีนในกลุ่มของการสังเคราะห์น้ำตาลคือ fructose 1,6-bisphosphatase gene (FBP) และยีนในกลุ่มของการสร้างโปรตีนคือ pyrroline-5-carboxylase synthetase gene (P5CS) มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น แต่ pyrroline-5-carboxylase reductase gene (P5CR) มีการแสดงออกลดลง

จากข้อมูลการทดลองคาดว่าหม่อนใช้กลไก antioxidation, detoxification และ osmoprotection ในใบ ในขณะที่รากอาจเลือกใช้กลไกในการปั๊มไอออนเพื่อรักษาสมดุลของแรงดันออสโมติกไว้

Netnapa Chingkiti 2008: Salt-Stress Response of Mulberry, *Morus Rotunbiloba*. Master of Science (Biochemistry), Major Field: Biochemistry, Department of Biochemistry. Thesis Advisor: Assistant Professor Amornrat Promboon, Ph.D. 172 pages.

Investigation of biochemical mechanisms against salt stress in a local mulberry, *Morus rotunbiloba* Koidz, namely mon noi, was performed by tissue culture techniques. The plants were grown for 3 weeks under 16 h photoperiod of $150 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ at 25°C with relative humidity of 70-80 %. After treated the plant cultures with various concentrations of sodium chloride for 1 week, leaf and root samples were collected at various time for determining of some enzyme activities, sugar and selected genes at transcriptional level.

After treated plant's cultures with NaCl at 300 and 500 mM, the enzymes including, ATPases, glucosidase, glutathione-S-transferase and peroxidases gave higher activities than the control sample. However, the cultures treated with NaCl at 100 and 600 mM showed the same level of enzyme activities. ATPase showed activity in leaf and root 3.5 and 5.5. times respectively, higher than in the control sample at 500 mM NaCl. Glucosidase gave 3 times higher than in leaf at 300 and 500 mM NaCl. Glutathione-S-transferase demonstrated the same activities of 3-4 times of the control sample at 300 and 500 mM NaCl. The neutral peroxidase in leaf gave 3.5 times higher than the control sample at 300 and 500 mM NaCl and higher than in the acidic and basidic peroxidase enzymes.

Determination of some selected sugars in both leaf and root samples were performed by HPLC. At least four kinds of sugars, namely fructose, glucose, mannitol and sucrose were greatly observed in leaf but not found in root tissue.

Some selected responsive genes were determined by RT-PCR. Mulberry leaf lectin gene gave higher and lower transcripts than control sample at 50 and 100 mM NaCl, respectively. Whereas responsive genes for sugar synthesis namely, fructose 1,6-bisphosphatase gene (FBP) and responsive gene for praline synthesis namely pyrroline-5-carboxylase synthetase gene (P5CS) gave higher activities, and pyrroline-5-carboxylase reductase gene (P5CR) gave lower activity than in the control sample.

These data suggested that mulberry plant has mechanisms for antioxidation, detoxification, and osmoprotection in leaf whereas ion pump may be used to maintain osmotic pressure in root tissue.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

/ /

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.อมรรัตน์ พรหมบุญ ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น ข้อเสนอแนะการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์ในการวิจัยและการเขียนวิทยานิพนธ์เป็นอย่างยิ่ง ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.สุนันทา รัตนโก กรรมการสาขาวิชาเอกที่ได้ช่วยให้คำแนะนำ และชี้แนะแนวทางในการแก้ปัญหาต่างๆ ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์สิทธิรักษ์ รอยตระกูล กรรมการสาขาวิชาเอกอีกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ตลอดจนชี้แนะแนวทางในการทำแลบ และอธิบายขั้นตอนการทำงานให้เข้าใจได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือต่างๆ ให้สามารถทำงานได้สะดวกขึ้น และขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.เลิศลักษณ์ เงินศิริ กรรมการสาขาวิชาการ ที่สามารถให้ความช่วยเหลือได้ตลอดเวลาในยามที่มีปัญหา

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ในภาควิชาชีวเคมีทุกท่านที่ให้ความรู้และให้ความช่วยเหลือในการศึกษาตลอดมา

ขอขอบคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ภายใต้สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) และเพื่อนๆ พี่น้องผู้ช่วยนักวิจัยที่มีมิตรไมตรี ให้ความช่วยเหลือและดูแลในขณะที่ทำวิจัยอยู่ด้วยกัน รวมทั้งสอนการใช้เครื่องมือต่างๆ

ขอขอบคุณทุนวิจัยมหาบัณฑิตของสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว.) สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และคณะวิทยาศาสตร์ (Window II) ปี พ.ศ. 2549 และทุนสนับสนุนมหาบัณฑิตของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี พ.ศ. 2549 ที่ได้ให้เงินทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้เป็นอย่างสูง

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ พี่ชายและญาติๆ ที่คอยให้กำลังใจ ส่งเสริมสนับสนุน และถามไถ่ติดตามการทำงานมาโดยตลอด รวมทั้งเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ที่รู้จักในภาคและนอกภาควิชา โดยเฉพาะอย่างยิ่งเพื่อนๆ ในห้องแลบที่รักทุกคน

เนตรนภา จิ่งกิติ

เมษายน 2551

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(9)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	39
อุปกรณ์	39
วิธีการ	43
ผลและวิจารณ์	54
ผล	54
วิจารณ์	90
สรุปและข้อเสนอแนะ	95
สรุป	95
ข้อเสนอแนะ	97
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	98
ภาคผนวก	110
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและสารเคมี	111
ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์	117
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	172

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 การตอบสนองต่อระดับความเค็มของพืชโดยทั่วไป	17
2 การคัดเลือกปลูกพืชในดินเค็ม	18
3 การเปลี่ยนแปลงของคาร์โบไฮเดรตในการตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือ	28
4 ผลของความเครียดจากเกลือต่อกิจกรรมของ plasma membrane H^+ -ATPase ในพืช	29
5 คูไพรเมอร์และลำดับเบสที่ใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่างๆ	53
6 ค่าเฉลี่ยของความจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity) ในใบ	70
7 ค่าเฉลี่ยของความจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity) ในราก	71
8 ปริมาณและคุณภาพของ RNA ทั้งหมดที่สกัดจากใบหม่อนน้อยที่ได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 300 และ 500 mM ในเวลาต่างๆ	85

ตารางภาคผนวกที่

ข1 ปริมาณโปรตีนและค่าความจำเพาะของเอนไซม์ ATPase ในใบ	120
ข2 ปริมาณโปรตีนและค่าความจำเพาะของเอนไซม์ ATPase ในราก	122
ข3 ปริมาณโปรตีนและค่าความจำเพาะของเอนไซม์ glucosidase ในใบ	124
ข4 ปริมาณโปรตีนและค่าความจำเพาะของเอนไซม์ glucosidase ในราก	126
ข5 ปริมาณโปรตีนและค่าความจำเพาะของเอนไซม์ GST ในใบ	128
ข6 ปริมาณโปรตีนและค่าความจำเพาะของเอนไซม์ GST ในราก	130
ข7 ปริมาณโปรตีนและค่าความจำเพาะของเอนไซม์ acidic peroxidase ในใบ	132
ข8 ปริมาณโปรตีนและค่าความจำเพาะของเอนไซม์ acidic peroxidase ในราก	134
ข9 ปริมาณโปรตีนและค่าความจำเพาะของเอนไซม์ basidic peroxidase ในใบ	136
ข10 ปริมาณโปรตีนและค่าความจำเพาะของเอนไซม์ basidic peroxidase ในราก	138
ข11 ปริมาณโปรตีนและค่าความจำเพาะของเอนไซม์ neutral peroxidase ในใบ	140
ข12 ปริมาณโปรตีนและค่าความจำเพาะของเอนไซม์ neutral peroxidase ในราก	142

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงไอออนที่มีการสะสมบริเวณภายในเซลล์	23
2	ความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ทำให้พืชที่ได้รับเกิดความเสียหายสองอย่าง	24
3	กลไกการกำจัด reactive oxygen species (ROS) ในเซลล์พืชโดยใช้และไม่ใช้เอนไซม์	34
4	การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ glutathione-S-Transferase (GST) ในการกำจัดสารพิษออกนอกเซลล์	35
5	กลไกการผลิตและสลายของโพรลีน	36
6	กลไกการสลายตัวของน้ำตาล 4 ชนิดที่สัมพันธ์กัน	37
7	กลไกการสังเคราะห์แมนนิทอลจากฟรุกโตส	38
8	กลไกการรักษาสมดุลไอออนในเซลล์พืช การปั๊มไอออนให้ผ่านเข้าออกทางเยื่อหุ้มเซลล์โดยได้รับพลังงานจากการสลาย ATP ไปเป็น PP _i	38
9	ผลของปริมาณน้ำตาลซูโครส (A) และน้ำตาลทรายท้องตลาดยี่ห้อมิตรผล (B) ต่อความสูงของต้นหม่อนในเวลา 1 เดือน	58
10	ผลของปริมาณน้ำตาลซูโครส (A) และน้ำตาลทรายท้องตลาดยี่ห้อมิตรผล (B) ต่อจำนวนใบของต้นหม่อนในเวลา 1 เดือน	59
11	ผลของปริมาณน้ำตาลซูโครส (A) และน้ำตาลทรายท้องตลาดยี่ห้อมิตรผล (B) ต่อจำนวนยอดของต้นหม่อนในเวลา 1 เดือน	60
12	ผลของปริมาณ BAP ในอาหารที่ใช้ น้ำตาลซูโครส (A) และน้ำตาลท้องตลาดยี่ห้อมิตรผล (B) ต่อความสูงของต้นหม่อนในเวลา 1 เดือน	61
13	ผลของปริมาณ BAP ในอาหารที่ใช้ น้ำตาลซูโครส (A) และน้ำตาลท้องตลาดยี่ห้อมิตรผล (B) ต่อจำนวนใบของต้นหม่อนในเวลา 1 เดือน	62
14	ผลของปริมาณ BAP ในอาหารที่ใช้ น้ำตาลซูโครส (A) และน้ำตาลท้องตลาดยี่ห้อมิตรผล (B) ต่อจำนวนยอดของต้นหม่อนในเวลา 1 เดือน	63

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	ลักษณะทางกายภาพของต้นหม่อนหลังย้ายลงปลูกในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 100, 300, 500 และ 600 mM ที่เวลาต่างๆ ดังนี้ 0 (A), 1 (B), 3 (C), 6 (D), 12 (E), 24 (F), 72 (G), 120 (H) และ 168 (I) ชั่วโมง	64
16	กิจกรรมของเอนไซม์ ATPase ทั้งหมดในเซลล์ที่ใบ (A) และราก (B) หลังจากได้รับความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน	70
17	กิจกรรมของเอนไซม์ ATPase ในแวคิวโอลในใบ (A) และราก (B) หลังจากได้รับความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน	71
18	กิจกรรมของเอนไซม์ Glucosidase ที่ใบ (A) และราก (B) หลังจากได้รับความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน	72
19	กิจกรรมของเอนไซม์ GST ที่ใบ (A) และราก (B) หลังจากได้รับความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน	73
20	กิจกรรมของเอนไซม์ acidic peroxidase ที่ใบ (A) และราก (B) หลังจากได้รับความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน	74
21	กิจกรรมของเอนไซม์ neutral peroxidase ที่ใบ (A) และราก (B) หลังจากได้รับความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน	75
22	กิจกรรมของเอนไซม์ basidic peroxidase ที่ใบ (A) และราก (B) หลังจากได้รับความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน	76
23	โครมาโตแกรมของน้ำตาลมาตรฐาน 4 ชนิด คือ น้ำตาลฟรุคโตส (A) น้ำตาลแมนนิทอลและกลูโคส (B) และน้ำตาลซูโครส (C)	82
24	ปริมาณน้ำตาลฟรุคโตส (A) น้ำตาลซูโครส (B) น้ำตาลแมนนิทอลและกลูโคส (B) ในใบหม่อนเมื่อได้รับความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน	83

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
25	ตัวอย่าง total RNA เมื่อแยกด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ total RNA ที่สกัดจากใบหม่อนน้อย (<i>M. rotundiloba</i>) 10 ไมโครกรัม ใน 1% อะกาโรสเจลที่มี MOPS buffer ที่ 100 โวลต์ 30 นาที และย้อมด้วยเอทิดียมโบรไมด์	84
26	การแสดงออกของต่างๆ ในใบหม่อนได้แก่ ยีนเลคติน (A), pyrroline-5-carboxylase synthetase gene (P5CS) (B), pyrroline-5-carboxylase reductase gene (P5CR) (C) และ fructose 1,6-bisphosphatase gene (FBP) (D) หลังจากได้รับความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ในเวลาต่างๆ โดยเปรียบเทียบกับยีน 26S rRNA (E) เป็นชุดควบคุม	88
27	การแสดงออกของยีนเลคตินในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	89

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ข1 กราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin	119
ข2 กราฟมาตรฐานของสารละลาย KH_2PO_4 ชุดที่ 1	146
ข3 กราฟมาตรฐานของสารละลาย KH_2PO_4 ชุดที่ 2	146
ข4 กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลฟรุคโตส	148
ข5 กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลซูโครส	148
ข6 กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลแมนนิทอลและกลูโคส	149
ข7 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในไบหม่อนชุดควบคุม (0 mM NaCl) ที่เวลา 0 ชั่วโมง	149
ข8 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในไบหม่อนชุดควบคุม (0 mM NaCl) ที่เวลา 1 ชั่วโมง	150
ข9 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในไบหม่อนชุดควบคุม (0 mM NaCl) ที่เวลา 3 ชั่วโมง	150
ข10 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในไบหม่อนชุดควบคุม (0 mM NaCl) ที่เวลา 6 ชั่วโมง	151
ข11 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในไบหม่อนชุดควบคุม (0 mM NaCl) ที่เวลา 12 ชั่วโมง	151
ข12 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในไบหม่อนชุดควบคุม (0 mM NaCl) ที่เวลา 24 ชั่วโมง	152
ข13 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในไบหม่อนชุดควบคุม (0 mM NaCl) ที่เวลา 3 วัน	152
ข14 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในไบหม่อนชุดควบคุม (0 mM NaCl) ที่เวลา 5 วัน	153
ข15 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในไบหม่อนชุดควบคุม (0 mM NaCl) ที่เวลา 7 วัน	153
ข16 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในไบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 100 mM ที่เวลา 0 ชั่วโมง	154
ข17 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในไบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 100 mM ที่เวลา 1 ชั่วโมง	154
ข18 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในไบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 100 mM ที่เวลา 3 ชั่วโมง	155
ข19 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในไบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 100 mM ที่เวลา 6 ชั่วโมง	155
ข20 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในไบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 100 mM ที่เวลา 12 ชั่วโมง	156
ข21 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในไบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 100 mM ที่เวลา 24 ชั่วโมง	156
ข22 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในไบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 100 mM ที่เวลา 3 วัน	157
ข23 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในไบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 100 mM ที่เวลา 5 วัน	157
ข24 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในไบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 100 mM ที่เวลา 7 วัน	158
ข25 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในไบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 300 mM ที่เวลา 0 ชั่วโมง	158

[illegible]

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่

หน้า

ข51	โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 600 mM ที่เวลา 7 วัน	171
-----	--	-----

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ATP	=	adenosine triphosphate
BAP	=	6-Benzylaminopurine
BADH	=	betain aldehyde dehydrogenase
bp	=	base pair
°C	=	degree Celsius
cDNA	=	complementary deoxyribonucleic acid
d	=	day
DDW	=	double distilled water
dNTP	=	deoxynucleotide-5-triphosphate
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetic acid
FBP	=	fructose 1,6-bisphosphatase
GST	=	glutathione-S-transferase
h	=	hour
HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography
Inv	=	invertase
kb	=	kilo base pairs
l	=	liter
LEA	=	putative late-embryogenesis-abundant
ManD	=	D-manital dehydrogenase
mg	=	milligram
min	=	minute
mM	=	millimolar
MOPS	=	3-(N-morpholino) propane sulfonic acid
mRNA	=	messenger ribonucleic acid
MS medium	=	Murashige and Skoog medium
NaOH	=	sodium hydroxide
PCR	=	Polymerase chain reaction
P5CR	=	pyrroline-5-carboxylase reductase

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

P5CS	=	pyrroline-5-carboxylase synthetase
PX	=	peroxidase
RNA	=	ribonucleic acid
rRNA	=	ribosomal ribonucleic acid
ROS	=	reactive oxygen species
RT-PCR	=	Reverse transcription polymerase chain reaction
s	=	second
TAE	=	Tris-acetate-EDTA electrophoresis buffer solution
μg	=	microgram
μl	=	microliter
%	=	percentage

การตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือของหม่อน

Salt-Stress Response of Mulberry, *Morus rotundiloba*

คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ประชากรส่วนใหญ่ประกอบอาชีพทางการเกษตร เช่นปลูกพืช และเลี้ยงสัตว์ ดังนั้นทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญเหล่านี้จึงมีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิต และการเจริญเติบโตทางด้านเศรษฐกิจของประเทศ ในภาวะปัจจุบันประเทศไทยกำลังประสบปัญหาทางด้านเศรษฐกิจ ทำให้มีผู้ว่างงานจำนวนมาก อาชีพการปลูกหม่อนเลี้ยงไหมอาจเป็นอาชีพหนึ่งที่รองรับปัญหาผู้ว่างงานได้ ดังนั้นเพื่อให้ประสบความสำเร็จในการปลูกหม่อนเลี้ยงไหมเชิงพาณิชย์ สิ่งหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงก็คือผลตอบแทนซึ่งขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ หลายประการ ได้แก่ คุณภาพของใบหม่อนและเส้นไหม จากการศึกษาพบว่าปัญหาอย่างหนึ่งที่พบในการปลูกหม่อนเลี้ยงไหมก็คือ การขาดแคลนหม่อนพันธุ์ดีซึ่งแข็งแรง ด้านทานโรคและให้ผลผลิตใบสูง

หม่อนเป็นอาหารเพียงชนิดเดียวของหนอนไหม โปรตีนในใบหม่อนมีประโยชน์ต่อการสร้างเส้นใยของหนอนไหม พบว่าประมาณ 70 % ของโปรตีนในเส้นใยไหมมาจากโปรตีนในใบหม่อน ดังนั้นคุณภาพของใบหม่อนจึงมีบทบาทสำคัญโดยตรงต่อคุณภาพ และปริมาณของรังไหม (Maji and Qadri, 1999) นอกจากนี้ในปัจจุบันได้มีการนำหม่อนไปแปรรูปเป็นสินค้าประเภทอาหารสมุนไพร และเครื่องสำอาง มีการนำใบหม่อนมาประกอบเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการ ในประเทศจีน ญี่ปุ่น รวมทั้งประเทศไทยได้นำใบหม่อนมาทำเป็นชาเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ เนื่องจากมีสรรพคุณเป็นยาสมุนไพรได้ (Shimizu *et al.*, 1992)

ปัจจุบันได้มีการคัดเลือกพันธุ์หม่อน และพยายามปรับปรุงพันธุ์ให้ได้หม่อนที่มีลักษณะดี เช่นให้ผลผลิตต่อไร่สูง มีการเจริญเติบโตดี แตกกิ่งเร็ว ขนาดใบใหญ่หนา อ่อนนุ่ม ไม่เหนียวง่าย มีสารอาหารสูง มีความต้านทานโรคต่าง ๆ ได้ดี อย่างไรก็ตามปัญหาที่ยังคงพบในการปลูกหม่อน ได้แก่ การเกิดโรคต่าง ๆ ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และพวกหนอนตัวกลมเป็นต้น โรคที่มักแพร่ระบาดในหม่อนได้แก่ โรครากเน่า (Root-Rot disease) และโรคใบไหม้ (Bacterial blight disease) โดยเฉพาะโรคใบไหม้มักมีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. *mori* ซึ่งจะทำให้ใบมีคุณภาพต่ำและผลผลิตลดลง หากเลี้ยงไหมด้วยใบที่มีคุณภาพต่ำเหล่านี้จะทำให้

ให้การผลิตรังไหมลดลง และได้เส้นไหมที่มีคุณภาพไม่ดีด้วย แม้ว่าหม่อนจะเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญ แต่ก็ยังขาดความจริงจังในการทำการศึกษาวิจัย ทำให้ยังไม่มีความรู้ความเข้าใจทางด้านชีววิทยา ชีวเคมีมากนัก ดังนั้นเพื่อเป็นการพัฒนาอุตสาหกรรมการปลูกหม่อนเลี้ยงไหมของไทย การปรับปรุงพันธุ์และพัฒนาคุณภาพของต้นหม่อน จึงเป็นสิ่งสำคัญประการหนึ่ง จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับเลคตินในพืชมากมาย เลคตินเป็นโปรตีนหรือโกลโคโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับคาร์โบไฮเดรตอย่างจำเพาะ ซึ่งคาร์โบไฮเดรตนี้อาจอยู่บนผิวเซลล์ของคน สัตว์ รวมทั้งจุลชีพชนิดต่าง ๆ ดังนั้นเลคตินจึงมีสมบัติในการทำให้เซลล์เกิดการจับกลุ่ม ตกตะกอน (agglutination) เราสามารถพบเลคตินกระจายอยู่ทั่วไปในทุกเนื้อเยื่อของพืชและมีอยู่ทั่วไปในอาณาจักรพืช ดังนั้นแสดงว่าเลคตินนี้ต้องเป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญ ซึ่งบทบาทหนึ่งที่เป็นไปได้ในทางสรีรวิทยาคือ บทบาทของ carbohydrate-binding protein ในการป้องกันต่อต้าน biotic stress ได้แก่ บทบาทในด้านการต่อต้านเชื้อก่อโรค (phytopathogenic) บทบาทในด้านการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ (microorganisms) บทบาทในด้านการต่อต้านแมลงศัตรูพืช (phytophagous insects and plant-eating animals) (Chrispeels and Raikhel, 1991) และ abiotic stress เช่นระดับความเข้มข้นของเกลือ (salinity) (Zhang *et al.*, 2000)

นอกจากนี้ดินเค็มยังเป็นปัญหาอย่างหนึ่งที่สำคัญ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของหม่อน เนื่องจากพื้นที่ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีการปลูกหม่อนเลี้ยงไหมมากที่สุดในประเทศ มีพื้นที่ที่เป็นดินเค็มอยู่ถึง 17.8 ล้านไร่ ดังนั้นการศึกษากลไกการทนเค็มในหม่อนจะทำให้เข้าใจถึงกลไกการปรับตัวของหม่อนต่อความเครียดจากเกลือได้มากขึ้น เพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์หม่อนทนเค็มต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนเนื้อเยื่อหม่อน
2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนเลคตินในการตอบสนองต่อความเครียด
3. เพื่อศึกษากลไกการตอบสนองของหม่อนต่อความเครียดจากเกลือ

การตรวจเอกสาร

1. หม่อน

หม่อน (*Morus sp.*) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ (family) Moraceae สกุล (genus) *Morus* มีหลายสปีชีส์ (species) ได้แก่ *Morus alba*, *Morus nigra*, *Morus indica*, *Morus leavigata*, *Morus bombycis* และ *Morus rotundiloba* เป็นต้น ลักษณะทั่วไปเป็นไม้ยืนต้นประเภทไม้พุ่มในเขตร้อนเขตกึ่งร้อน และเขตหนาว ลักษณะสำคัญของพืชตระกูลนี้คือ มียาง ขน และเส้นใย ใบมีรูปร่างแตกต่างกัน มีทั้งที่เป็นแฉกและไม่เป็นแฉก หม่อนแต่ละต้นจะมีเพียงเพศเดียว คือเพศผู้หรือเพศเมีย ด้วยเหตุนี้จึงทำให้หม่อนเป็นพืชที่สามารถผสมข้ามพันธุ์ได้ ในจำนวนหม่อนหลายสปีชีส์นี้พบว่าพวก diploid เช่น *M. alba* เป็นสปีชีส์ที่มีการปลูกกันแพร่หลาย ส่วนพวก polyploidy จะให้ผลผลิตใบมาก และใบมีคุณภาพสูง ในหม่อนสายพันธุ์ต่างๆ จะให้ผลผลิตและคุณภาพของใบที่แตกต่างกัน หม่อนเจริญได้ดีในดินเกือบทุกชนิดโดยต้องการความชุ่มชื้นเล็กน้อยระยะเริ่มต้น ใบหม่อนจะมียางสีขาวที่เต็มไปด้วย sugar-mimic alkaloids, 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol (D-AB1) และ 1-deoxynojirimycin (DNJ) ไหลซึมออกมา ซึ่งสามารถป้องกันแมลงที่เป็นศัตรูพืชได้ sugar-mimic alkaloids จะไปยับยั้ง sugar-metabolizing enzymes และเป็นพิษต่อหนอนไหมอิตาลี (*Eri silkworm*), *Samia ricini* และศัตรูพืชทั่วไปแต่จะไม่มีผลต่อหนอนไหมบ้าน *Bombyx mori* (Hirayama *et al.*, 2007)

หม่อนน้อย (*M. rotundiloba*) เป็นหม่อนพันธุ์พื้นเมืองที่ให้ดอกเป็นเพศผู้ ช่อดอกจะมีดอก 1-2 ดอก นิยมปลูกเพื่อใช้เลี้ยงไหม ลำต้นมีสีน้ำตาล และโปร่งสูง กิ่งมีขนาดใหญ่ มี lenticel รูปร่างกลมหรือค่อนข้างกลม ตาเป็นสีเขียวออกน้ำตาลอ่อนรูปทรงสามเหลี่ยมมีขนาดใหญ่ มีตามากโดยแบนติดแนบอยู่กับกิ่ง ใบใหญ่ ลักษณะคล้ายรูปหัวใจยาว (long heart) ปลายใบแหลม ขอบใบเว้าเป็นแฉกตื้น ๆ ประมาณ 1-2 แฉกเท่านั้น ยอดชี้ตรง ใบหนาเป็นมันสีเขียวมันวาว ตามใบมีขนน้อยมากไม่รู้สึกละสากมือเมื่อลูบที่ใบ (Ratanachata, 1972) ขยายพันธุ์ได้ง่าย โดยใช้ท่อนพันธุ์ปักชำในแปลงโดยตรง ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่แห้งแล้งได้ดี (Iwata, 1972) สามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ค่อนข้างต่ำ จนถึงดินที่มีความอุดมสมบูรณ์สูงเป็นพันธุ์ที่มีการเจริญเติบโตดี หม่อนพันธุ์นี้มีข้อเสียคือเป็นโรครากเน่าได้ง่าย (Itoi and Boonnab, 1974) ใบแก่มีการสะสมของคาร์โบไฮเดรต เส้นใยและเถ้ามากกว่าในใบอ่อน ในทางตรงกันข้ามใบอ่อนจะมีโปรตีนไขมันและไนโตรเจนสะสมมากกว่าในใบแก่ (Chinchiam, 1975)

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ในปัจจุบันมีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้โดยนำเซลล์เนื้อเยื่อหรืออวัยวะส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญของพืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ในสภาพปลอดเชื้อ (aseptic condition) ภายใต้การควบคุมสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิ แสงสว่าง และความชื้น เป็นต้น โดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนิยมนำเนื้อเยื่อจากต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ดแบบปลอดเชื้อ เพราะทุกชิ้นส่วนของต้นอ่อนสามารถนำมาใช้เป็นเนื้อเยื่อตั้งต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ส่วนเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนต่างๆ ที่ได้จากพืชต้องนำมาฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวก่อนนำไปใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถทำให้บนอาหารวุ้นกึ่งแข็ง (agar medium) และในอาหารเหลว (liquid medium) ซึ่งในอาหารเหลวจะนิยมทำบนเครื่องเขย่า เพื่อเพิ่มออกซิเจนให้แก่เซลล์ หลังจากเลี้ยงเนื้อเยื่อไปได้ระยะหนึ่งต้องทำการถ่ายเนื้อเยื่อลงบนอาหารใหม่ (subculturing) เนื่องจากอาหารเดิมลดย่อยลงและของเสียที่เซลล์ขับออกมาเพิ่มมากขึ้น

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอาศัยหลักการ totipotency ที่ว่า เซลล์พืชเดี่ยว ๆ (single cells) ทุกเซลล์มีลักษณะและองค์ประกอบทางพันธุกรรมสมบูรณ์เหมือนต้นแม่ ซึ่งสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นพืชทั้งต้นได้ เซลล์พืชเหล่านี้ไม่ว่าจะเป็นเซลล์ที่เจริญเต็มที่ (mature cell) หรือเนื้อเยื่อที่มีการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะอย่าง (differentiated tissue) ได้แก่ เนื้อเยื่อใบ สามารถเจริญและแบ่งตัวเป็นแคลลัส (callus) หรือพัฒนาเป็นอวัยวะ (organ) เช่น ยอดอ่อน (shoot) และราก (root) ซึ่งสามารถเจริญต่อไปเป็นต้นพืชทั้งต้นได้ แคลลัสซึ่งเป็นก้อนของกลุ่มเนื้อเยื่อพื้นฐานของพืชที่ประกอบด้วยเซลล์ที่มีผนังบาง (parenchyma cells) ซึ่งยังไม่มีเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะเจาะจง (undifferentiated cells) สามารถเจริญและแบ่งตัวเป็นแคลลัส หรือพัฒนาเป็นยอดอ่อน และรากขึ้นกับการกระตุ้นของตัวควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสม (Caponetti *et al.*, 1996)

จากหลักการนี้ได้มีการประยุกต์เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปใช้ประโยชน์ในทางเกษตรกรรมต่าง ๆ อาทิเช่น

1. ใช้ในการขยายพันธุ์พืช (micropropagation) โดยเฉพาะพืชที่มีค่าทางเศรษฐกิจ พืชที่มีปัญหาด้านการเพาะปลูกเนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม
2. สามารถนำต้นพืชที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เจริญในสภาพปลอดเชื้อไปใช้ในการผลิตพืชที่ปลอดโรค ซึ่งเป็นการกำจัดโรคไวรัสและแบคทีเรียในพืช

3. เลคตินในพืช

เลคตินเป็นโปรตีน หรือไกลโคโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับคาร์โบไฮเดรตอย่างจำเพาะ โดยคาร์โบไฮเดรตนี้อาจอยู่บนผิวเซลล์ของคน สัตว์รวมทั้งจุลชีพชนิดต่าง ๆ เนื่องจากเลคตินมีสมบัติในการทำให้เซลล์เกิดการจับกลุ่มตกตะกอน (agglutination) จึงเรียกเลคตินอีกอย่างหนึ่งว่า แอ็กกลูตินิน (agglutinin) นอกจากนี้การที่เลคตินสามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์หลายชนิดจับกลุ่มตกตะกอนได้ จึงเรียกเลคตินได้อีกอย่างว่าฮีมาแอ็กกลูตินิน (hemagglutinin) เลคตินสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่นในไวรัส ผนังเซลล์และไซโตพลาสซึมของแบคทีเรีย โครงสร้างส่วนผิวของเชื้อรา ยีสต์และโปรโตซัว ส่วนในสัตว์สามารถพบเลคตินได้ทั้งในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่นแมลง กุ้ง ปู และในสัตว์มีกระดูกสันหลังเช่นน้ำในเลือดของปลา พืช ในสัตว์ปีกจะพบเลคตินในไข่ น้ำเลือดและเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะพบในไข่ เม็ดเลือดขาว สเปิร์ม และเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่จะพบเลคตินในส่วนต่างๆ ของลำต้น

3.1 การจำแนกชนิดของเลคตินในพืช

3.1.1 การจำแนกเลคตินโดยอาศัยความจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรต (Goldstein and Poretz, 1986)

เลคตินจำแนกตามความจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรตได้เป็น 5 ประเภทคือ

3.1.1.1 Glucose/Mannose-binding lectins เลคตินชนิดนี้สามารถจับกับน้ำตาลกลูโคสหรือแมนโนสได้ เช่น เลคตินที่พบใน *Vicia faba* (Fava bean), *Canavalia ensiformis* (Jack bean), *Galanthus nivalis*, *Pisum sativum* (Pea) เลคตินกลุ่มนี้ต้องการไอออนโลหะ, Mn^{2+} , Ca^{2+} ในการจับอย่างจำเพาะกับน้ำตาลแมนโนสหรือกลูโคส

3.1.1.2 Galactose/N-Acetylglucosamine-binding lectins เลคตินชนิดนี้สามารถจับกับน้ำตาล N-Acetylglucosamine และน้ำตาล Galactose เช่น เลคตินที่พบใน *Psophocarpus tetragonolobus*, *Dolichos biflorus*, *Phaseolus vulgaris*, *Ricinus communis*

3.1.1.3 N-Acetylglucosamine-binding lectins เลคตินชนิดนี้สามารถจับกับน้ำตาล N-Acetylglucosamine เช่น เลคตินที่พบใน *Solanum tuberosum*, *Datura stramonium*, *Oryza sativa*

3.1.1.4 L-fucose-binding lectins เลคตินชนิดนี้สามารถจับกับน้ำตาล fucose เช่น เลคตินที่พบใน *Locus tetragonolobus*, *Ulex europaeus* เลคตินกลุ่มนี้มักถูกนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านเซรัมวิทยา

3.1.1.5 Sialic acid-binding lectins เลคตินชนิดนี้ไม่ค่อยพบในพืช แต่มีพืชบางชนิดที่พบเลคตินนี้ได้แก่ *Maackia amurensis* และ *Sambucus nigra* โดยมากจะพบ sialic acid อยู่ที่ปลายสายของไกลโคคอนจูเกตในเซลล์และเนื้อเยื่อ

3.1.2 การจำแนกเลคตินโดยอาศัยโครงสร้างโมเลกุล, ลำดับกรดอะมิโนในสายโพลีเปปไทด์และลักษณะทางชีวเคมี

เลคตินสามารถจำแนกตามวิวัฒนาการของโปรตีนได้เป็น 7 กลุ่ม คือ

3.1.2.1 Legume lectins (Sharon and Lis, 1990) เป็น homologous protein ที่พบในพืชวงศ์ leguminosae มักจะพบเลคตินชนิดนี้ตามราก ใบ ลำต้นหรือเปลือกไม้ของพืช legume lectins มีความแตกต่างจากเลคตินกลุ่มอื่นๆ ตรงที่มีความสามารถในการจับกับคาร์โบไฮเดรตได้อย่างจำเพาะ พวก legume lectins ส่วนใหญ่มักจะเป็นพวก glucose/mannose-binding lectins ซึ่งได้แก่ *Canavalia ensiformis* lectin, *Pisum sativum* lectin และพวก galactose/N-Acetylgalactosamine-binding lectins ซึ่งได้แก่ *Arachis hypogaea* lectin, *Sophora japonica* lectin

นอกจากนี้ยังมี legume lectins ที่มีความจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรตอื่น เช่น จำเพาะกับ L-fucose ได้แก่ *Ulex europaeus* lectin จำเพาะกับ chitobiose ได้แก่ *Cytisus sessilifolius* lectin, จำเพาะกับ N-Acetylneuraminic acid α (2,3) Galactose/N-Acetylgalactosamine ได้แก่ *Maackia amurensis* lectin และยังมี legume lectins บางชนิดที่ไม่จับกับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวแต่จะจับกับน้ำตาลพวกโอลิโกแซคคาไรด์ ได้แก่ *Phaseolus vulgaris* lectin

3.1.2.2 Chitin-binding lectins containing hevein domains (Raikhel *et al.*, 1993) มักประกอบด้วย hevein domains 1 โดเมนหรือมากกว่า ส่วนใหญ่เลคตินชนิดนี้มักจะจับกับ N-acetylglucosamine (GlcNAc), GlcNAc-oligomer และ N-acetylneuraminic acids เราสามารถพบเลคตินชนิดนี้ได้ในพื้นที่หลายสกุล ได้แก่ Gramineae, Solanaceae, Papaveraceae, Urticaceae, Euphorbiaceae, Phytolaccaceae และ Viscaceae

3.1.2.3 Type 2 ribosome inactivating protein (RIP) (Barbieri *et al.*, 1993) เลคตินประเภทนี้จัดเป็น cytotoxic agents ที่มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตพวกลูกศรียอด เลคตินนี้ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เหมือนกันจำนวน 1, 2 หรือ 4 หน่วยย่อย แต่ละหน่วยย่อยประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ 2 สายซึ่งมีโครงสร้างและหน้าที่ต่างกัน คือสาย A และสาย B โมเลกุลของน้ำตาลบนสาย B จะจับเกาะกับ glycoconjugate receptor บนผิวเซลล์ การจับเกาะนี้จะเหนี่ยวนำให้สาย A ผ่านเข้าไปในเซลล์ แล้วสาย A จะเร่งการยับยั้งไรโบโซมของยูคาริโอต

3.1.2.4 Monocot mannose-binding lectins (Van Damme *et al.*, 1995) เป็นเลคตินชนิดแรกที่พบในส่วนหัวของต้น snowdrop (*Galanthus nivalis*) เนื่องจากความจำเพาะของเลคตินชนิดนี้ในการจับกับน้ำตาล mannose ในพืช monocotyledon จึงเรียกเลคตินชนิดนี้ว่า monocot mannose-binding lectins

3.1.2.5 Cucurbitaceae phloem lectins (Subnis *et al.*, 1978) เป็น dimeric chitin-binding lectin ที่พบใน phloem sap ของ *Cucurbita* sp. เลคตินชนิดนี้มีความจำเพาะกับ oligomer ของ GlcNAc และมีความสามารถในการจดจำโมเลกุล N-acetylglucosamine

3.1.2.6 Amaranthin (Rinderle *et al.*, 1989) เป็นเลคตินที่พบในเมล็ดของพืช *Amaranthus* เลคตินชนิดนี้ส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิด acidic และ cuminat amino acids amaranthin สามารถถูกยับยั้งโดย GalNAc

3.1.2.7 Jacalin-related lectins (Sastri *et al.*, 1986) เลคตินในกลุ่มนี้แบ่งออกได้อีกเป็น 2 ประเภท คือเลคตินที่มีความจำเพาะกับ galactose และเลคตินที่มีความจำเพาะกับ mannose

เลคตินกลุ่ม Jacalin-related lectins เป็นเลคตินที่ได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากเลคตินในกลุ่มนี้สามารถพบได้ทั่วไปในพืชชั้นสูง และอาจเกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่เป็นโมเลกุลป้องกันในพืชด้วย เลคตินชนิดนี้พบครั้งแรกในพืชจำพวกขนุน (*Artocarpus integrifolia*) โดยพบในส่วนเมล็ดขนุน (Jack fruit seeds) เรียกว่า Jacalin (Yang and Czapla, 1993; Zhang *et al.*, 2000; Van Damme *et al.*, 1999; Peumans *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังพบใน *Artocarpus* สปีชีส์อื่น รวมทั้งพวก Osage orange (*Maclura pomifera*) ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Moraceae สำหรับ *Artocarpus* lectins ทุกชนิด และ *Maclura pomifera* agglutinin มีโครงสร้างระดับโมเลกุลเหมือนกัน มีความจำเพาะกับน้ำตาล Gal β 1-3 GalNAc และมีลำดับเบสที่เหมือนกันมาก นอกจากนี้ยังพบเลคตินชนิดนี้ในพืชวงศ์อื่นด้วย จากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของเลคตินชนิดนี้พบว่าเลคตินพวกนี้มีลำดับการจัดเรียงของกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ Jacalin จึงเรียกเลคตินกลุ่มนี้ว่า Jacalin-related lectin ได้แก่ เลคตินที่พบในรากของ hedge bindweed (*Calystegia sepium*) ซึ่งอยู่ในวงศ์ Convolvulaceae (Van Damme *et al.*, 1996) เลคตินชนิดนี้เป็น mannose/maltose-specific lectin และยังพบในส่วนหัวของ Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) อยู่ในวงศ์ Asteraceae (Bourne *et al.*, 1999) ในผลกล้วย (*Musa acuminata*) วงศ์ Musaceae ก็พบเลคตินที่จัดในกลุ่มนี้เช่นกัน (Peumans *et al.*, 2000) เลคติน 2 ชนิดหลังนี้มีความจำเพาะกับน้ำตาลแมนโนส

4. บทบาททางสรีรวิทยาของเลคตินในพืช

จากการที่เลคตินสามารถจดจำและจับกับคาร์โบไฮเดรตได้อย่างจำเพาะ จึงได้มีสมมุติฐานหลายแนวทางในการนำเสนอบทบาทของเลคติน โดยกล่าวว่าเลคตินที่พบภายในพืชนั้นมีความสามารถในการจับกับคาร์โบไฮเดรตภายในพืชนั่นเอง เชื่อว่าเลคตินเหล่านี้น่าจะมีความสำคัญในด้านต่าง ๆ เช่นการขนส่งน้ำตาล เป็นโปรตีนสะสม ควบคุมการแบ่งเซลล์ เป็นต้น ส่วนเลคตินที่มีความสามารถจับกับคาร์โบไฮเดรตที่อยู่ภายนอกพืชนั้น ได้แก่ เลคตินที่จับกับกรดเซียลิก ซึ่งมักจะพบเป็นน้ำตาลที่อยู่ปลายของไกลโคคอนจูเกต เลคตินพวกนี้อาจทำหน้าที่เกี่ยวกับการเป็นโมเลกุลป้องกัน สามารถป้องกันการรุกรานของไวรัส แบคทีเรีย เชื้อรา รวมทั้งแมลงศัตรูพืช จากรายงานการวิจัยเกี่ยวกับเลคตินในพืชมากมายต่างเสนอบทบาทของเลคตินในแง่ของการเป็นโมเลกุลป้องกัน ดังนั้นเลคตินที่พบในใบหอมจึงอาจเกี่ยวข้องกับหน้าที่นี้ด้วย เนื่องจากเลคตินมีความสามารถในการจับอย่างจำเพาะกับส่วนคาร์โบไฮเดรตของไกลโคคอนจูเกต (glycoconjugate) ที่พบบนผิวหน้าของจุลินทรีย์ เช่นไวรัส แบคทีเรีย เชื้อรา หรือพบบนผิวหน้าระบบทางเดินอาหารในแมลง รวมทั้งสัตว์กินพืชชนิดต่าง ๆ ดังนั้นเลคตินจึงอาจทำหน้าที่เป็นโมเลกุลจดจำ (recognition

molecules) ภายในเซลล์ ระหว่างเซลล์ หรือระหว่างสิ่งมีชีวิต เลคตินถูกพบในพืชหลายสปีชีส์ ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ กัน (Chrispeels and Raikhel, 1991) เลคตินจากพืชต่างสปีชีส์มักมีความแตกต่างกันในโครงสร้างของโมเลกุล และความจำเพาะในการจับกับน้ำตาล (Peumans and Van Damme, 1995) นอกจากเลคตินในพืชจะสามารถจับกับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเช่นกลูโคส แมนโนส และกาแลคโทสแล้ว เลคตินยังสามารถจับกับโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มักไม่พบในพืชเอง ดังนั้นเลคตินจึงน่าจะมีบทบาทสำคัญทางชีวภาพในด้านการเป็นโมเลกุลที่ทำหน้าที่ต่อต้านการรุกรานของจุลินทรีย์แมลง และสัตว์กินพืชชนิดต่าง ๆ

4.1 บทบาทในการต่อต้านเชื้อรา

เลคตินประเภทนี้มีความจำเพาะกับไคติน (poly N-acetylglucosamine) จึงสามารถป้องกันพืชจากเชื้อราบางชนิดได้ Brockaert (1989) ได้ทำการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าเลคตินจาก stinging nettle (*Urtica dioica*) สามารถยับยั้งฤทธิ์ของเชื้อราหลายชนิดที่ก่อให้เกิดโรคได้ ต่อมา Does *et al.* (1999) ได้ใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมทำ transgenic plant โดยฝากถ่ายยีนที่กำหนดการสร้างเลคติน *Urtica dioica* agglutinin (UDA) เข้าไปในต้นยาสูบ (tobacco, *Nicotiana tabacum*) พบว่าเลคตินที่สกัดได้จากต้นยาสูบมี biological activity เหมือนกับเลคตินที่สกัดได้จาก stinging nettle จากการศึกษาสมบัติการต่อต้านเชื้อราในหลอดทดลองพบว่า UDA สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตในระยะจำเพาะบางระยะของเชื้อราจำพวก *Botrytis cinerea* *Treichoderma viride* และ *Colletotrichum lindemuthianum* นอกจากนี้ยังมีการศึกษาบทบาทในการต่อต้านเชื้อราของเลคตินในเมล็ดข้าวสาลี (wheat germ agglutinin, WGA) พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสปีชีส์ *Fusarium* ได้แก่ *F. graminearum* และ *F. oxysporum* (Ciopraga *et al.*, 1999)

4.2 บทบาทในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย

Brockaert and Peumans (1989) ได้ทำการศึกษาสมบัติของเลคตินจากเมล็ดของ thorn apple (*Datura stramonium*) ซึ่งเป็น Chitin-binding lectins พบว่าเลคตินชนิดนี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต และการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียที่อยู่ระหว่างน้ำกับอากาศ (air-water interface) จึงทำให้สามารถป้องกันการบุกรุกของแบคทีเรียต่อเมล็ดที่งอกได้ ต่อมา Moreno *et al.*, (1997) ได้ทำการสกัดแยกเลคตินจากมะเขือเทศแล้วทำให้บริสุทธิ์ (*Cyphomandra betacea* Sendt) พบว่าเลคตินชนิดนี้เป็น chitin-binding lectins มีสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในพืชได้

4.3 บทบาทในการต่อต้านแมลง

เลคตินในพืชบางชนิดมีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการป้องกันการรุกรานจากแมลงที่เป็นศัตรูพืช ตัวอย่างเช่น wheat germ agglutinin สามารถป้องกันการรุกรานจาก cowpea weevil (*Callosobruchus cuminate*) รวมทั้งแมลงที่เป็นศัตรูของข้าวโพด ได้แก่ European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) และ Southern corn rootworm (*Diabrotica undecimpunctata*) (Murdock *et al.*, 1990) นอกจากนี้ยังพบว่าเลคตินจาก wheat germ มันฝรั่ง เมล็ดถั่วลิสง thorn apple และ Osage orange (*Maclura pomifera*) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการพัฒนาดำรงตัวของแมลง Cowpea weevil ได้ด้วยเช่นเดียวกัน (Peumans and Van Damme, 1995)

4.4 บทบาทในการเกิดพิษต่อสัตว์ชั้นสูง

เลคตินในเมล็ดถั่ว common bean (*Phaseolus vulgaris*) จะมีผลทำให้เกิดพิษต่อสัตว์หลายชนิดเมื่อกินถั่วนี้เป็นอาหารขณะที่ยังดิบ ทำให้เกิดความผิดปกติของลำไส้เล็ก (Pusztai *et al.*, 1990) มีการศึกษาเลคตินในพืชชนิดอื่นเช่น black locust (*Robinia pseudoacacia*) และ elderberry (*Sambucus nigra*) พบว่ามีผลทำให้สัตว์เกิดอาการเป็นพิษเหมือนกับการเกิดพิษจาก Phytohemagglutinin, PHA ซึ่งเป็นเลคตินจากเมล็ดถั่ว common bean (*Phaseolus vulgaris*) มีผลทำให้เกิดความผิดปกติของลำไส้เล็ก (Peumans and Van Damme, 1995)

5. เลคตินในหม่อน

Ratanapo *et al.* (1998) ได้ค้นพบเลคตินจากใบหม่อน (mulberry leaf lectin, MLL) เป็นครั้งแรก จากการสกัดเลคตินจากใบหม่อนให้บริสุทธิ์พบว่า มี 2 ชนิดคือ MLL1 และ MLL2 ซึ่งสามารถจับกับน้ำตาล N-glycolylneuramic acid ซึ่งเป็นอนุพันธ์ตัวหนึ่งของกรดเซียลิกได้อย่างจำเพาะ MLL1 และ MLL2 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันประมาณ 51,000 แต่ประกอบด้วยน้ำตาล 8.8 และ 40% ตามลำดับ โดยทั่วไปเลคตินในพืชมีส่วนน้อยเท่านั้นที่จับอย่างจำเพาะกับกรดเซียลิกที่เป็นโมเลกุลเดี่ยว กรดเซียลิกเป็นน้ำตาลที่ไม่พบในพืช ดังนั้นเลคตินจากใบหม่อนจึงไม่น่ามีบทบาทในการเป็นโปรตีนสะสมหรือโมเลกุลจลจลในพืช แต่คาดว่าจะมีบทบาทหน้าที่ที่เป็นไปได้ อย่างหนึ่งคือทำหน้าที่ในการเป็นโมเลกุลป้องกันต่อต้านการรุกรานของจุลินทรีย์และไวรัสที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคในหม่อน และอาจมีบทบาทต่อหนอนไหมคือมีผลต่อการกินใบหม่อนและการ

เจริญเติบโตของหน่อใหม่ ซึ่งมีรายงานผลของเลคตินจากพืชต่ออัตราการย่อยและการดูดซึมอาหารของสัตว์ชั้นสูงโดยไปยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง

Ratanapo *et al.* (2001) ได้ศึกษาบทบาทของเลคตินที่สกัดบริสุทธิ์พบว่า MLL1 สามารถตกตะกอนแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. *mori* ซึ่งทำให้เกิดโรคใบไหม้ในหม่อน (Bacterial blight disease) ได้ ในขณะที่ MLL2 ยังไม่ทราบบทบาทที่แน่ชัด การที่เลคติน MLL1 สามารถจับกลุ่มตกตะกอนเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. *mori* เป็นการสนับสนุนบทบาทที่เป็นไปได้ของเลคตินในการทำหน้าที่เป็นโมเลกุลป้องกันที่ต่อต้านการรุกรานของจุลชีพที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคในหม่อน จากการรายงานการศึกษาการจับของ legume lectin ที่มีความจำเพาะกับน้ำตาลแตกต่างกันสามารถจับกับ muramic acid, N-acetylmuramic acid และ muramyl dipeptide ในส่วนของผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ เลคตินจากใบหม่อนก็อาจจะไม่ได้จับกับน้ำตาล N-glycolylneuraminic acid ในส่วนของผนังเซลล์ของแบคทีเรียเพียงชนิดเดียว แต่จะจับกับน้ำตาล N-acetylneuraminic acid และ galactose องค์ประกอบอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องในผนังเซลล์ของแบคทีเรียด้วย การจะอธิบายการจับอย่างจำเพาะระหว่าง MLL1 และ เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. *mori* จะต้องศึกษาถึงคาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์เพิ่มเติม

Van Damme *et al.* (2002) พบว่าในเปลือกไม้ของ *M. nigra* ประกอบด้วยเลคตินในปริมาณสูงมาก 2 ชนิด ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม jacalin-related lectin แต่มีความจำเพาะแตกต่างกันคือ galactose-specific (MornigaG) และ mannose-specific (MornigaM) jacalin-related lectins นอกจากนี้ยังพบว่าเลคตินทั้ง 2 ชนิดนี้มีโครงสร้างโมเลกุลและมีลำดับเบสคล้ายคลึงกันสูงมาก

Kankamol (2003) ได้ทำการโคลนยีนเลคตินจากใบหม่อนตลอดสาย และพบว่ายีนเลคตินนี้มีอย่างน้อย 4 isoforms ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 895 bp ซึ่งประกอบด้วย 648 bp ORF เมื่อเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นกรดอะมิโนพบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 216 เรซิดิวส์ จากการตรวจสอบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับเลคตินอื่นๆ ในฐานข้อมูลพบว่าเลคตินในใบหม่อนเหมือนกับ *Morus nigra* galactose-binding lectin, *Maclura pomifera* agglutinin, jacalin, *Artocarpus integrifolia* mannose-binding lectin, *Morus nigra* mannose-binding lectin, *Musa cuminata*, และ *Oryza sativa* mannose-binding lectin ร้อยละ 95, 78, 76, 57, 55, 35, และ 17 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค northern blot พบว่ามีระดับการแสดงออกของยีนเลคตินในยอดสูง และจะพบน้อยลงในรากและดอก แต่จะไม่พบในเปลือกและใบแก่ นอกจากนี้สายพันธุ์

หม่อนที่ต่างกันจะมีการแสดงออกของยีนเลคตินที่ต่างกันด้วย โดยพันธุ์คุณไพ พันธุ์บุรีรัมย์ 60 พันธุ์บุรีรัมย์ 4/2 จะมีระดับการแสดงออกสูง ข้อมูลของยีนเลคติน MLL1 รวมกับข้อมูลอื่นๆ จากฐานข้อมูลเลคตินนำมาใช้ในการระบุสายพันธุ์หม่อนที่ต่างกัน 40 ชนิด ด้วยเทคนิค PCR และ RFLP จากการทำให้ PCR marker จะให้แถบของ polymorphism 28 แถบ จัดเป็น 5 กลุ่ม ผลจากการทำ PCR-RFLP ให้ผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DraI* ออกมา 6 แบบ จาก 2 วิธีพบว่าพันธุ์ผลใหญ่วาวี และบ้านหลวงมีความใกล้เคียงทางสายพันธุ์ จากการทำให้ RFLP แบ่งได้เป็น 7 แบบจากหม่อน 18 ชนิด

Hossain (2004) พบ galactose-binding lectins ในส่วนของเมล็ดหม่อน (*M. alba* L.) จากการสกัดเลคตินจากเมล็ดหม่อนให้บริสุทธิ์พบว่า มี 3 ชนิดคือ MSL-1, MSL-2 และ MSL-3 มีขนาดประมาณ 175, 120 และ 89 kDa ตามลำดับ ประกอบด้วยน้ำตาล 5.6, 5.3 และ 4.5 % ตามลำดับ ใน MSL-1 พบว่ามี 2 subunit ในธรรมชาติจับกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ มีน้ำตาลกลูโคสและแมนโนสเป็นองค์ประกอบ ส่วน MSL-2 และ MSL-3 มี 4 non-identical subunit ในธรรมชาติ จับกันด้วยพันธะ nonionic hydrophobic interaction มีน้ำตาลกาแลคโตสเป็นองค์ประกอบ

Ratanapo *et al.* (2005) รายงานผลของเลคตินจากใบหม่อนต่อเอนไซม์โปรติเอสในระบบย่อยอาหารของหนอนไหม โดยทำการสกัดเอนไซม์โปรติเอสจากน้ำย่อยของหนอนไหมพันธุ์นางลายได้ 6 ชนิด เรียก P1-P6 โดย proteolytic activity จะถูกยับยั้งด้วย trypsin inhibitor จากการศึกษาผลของเลคตินจากใบหม่อน MLL1 และ MLL2 ต่อ proteolytic activity ของเอนไซม์โปรติเอสพบว่า P4, P5 และ P6 ทำให้อัตราการเกิด proteolytic activity ลดลง แต่จะไม่พบการยับยั้งใน MLL ที่มีการจับกับน้ำตาล *N*-glycolylneuraminic และ *N*-acetylneuraminic acid จากผลที่ได้คาดว่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสโดยเลคตินในพืช ไม่เกี่ยวข้องกับการจับของตำแหน่งการจับกับน้ำตาลของเลคติน แต่น่าจะเกี่ยวกับการเกิดโครงสร้างเชิงซ้อนระหว่างเลคตินและเอนไซม์โปรติเอสจากน้ำย่อย การศึกษาต่อไปเพิ่มเติมจะสามารถนำมาอธิบายชนิดของตัวยับยั้งเอนไซม์ได้ ผลการยับยั้ง proteolytic activity จะเกิดขึ้นก่อนที่หนอนไหมจะย่อยโปรตีนในอาหาร การที่เลคตินในใบหม่อนลดการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสอาจเป็นสาเหตุให้หนอนไหมมีขนาดเล็ก ผลิตเส้นใยได้น้อย

Chingkitti *et al.* (2006) สามารถหาตำแหน่งอินทรอนบนจีโนมิกดีเอ็นเอบนยีนเลคตินในใบหม่อนน้อย โดยออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อหม่อน 5 คู่ จาก cDNA ของยีนเลคตินในใบหม่อนน้อยให้มีลำดับเบสที่เชื่อมคาบเกี่ยวกัน พบว่าในยีนเลคตินมีอินทรอนอย่างน้อย 2 ตำแหน่ง คือในตำแหน่งที่ 1-132 และมากกว่า 564 จากการออกแบบไพรเมอร์ที่ตำแหน่ง 334-693 สามารถนำไปใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ที่จัดอยู่ใน 5 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ หม่อนพันธุ์พื้นเมือง หม่อนพันธุ์รับรอง หม่อนพันธุ์ต่างประเทศ หม่อนพันธุ์ลูกผสม และหม่อนป่า โดยจำแนกตามขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ คือขนาด 800, 700 และ 600 คู่เบส นอกจากนี้ยังพบว่าไพรเมอร์นี้มีความจำเพาะต่อหม่อนเท่านั้น เนื่องจากไม่สามารถใช้กับพืชตระกูลอื่นที่อยู่ในวงศ์ Moraceae เช่น กร่าง และปอสาได้

Getsang *et al.*, (2006) ได้ศึกษาโครงสร้างสามมิติของเลคตินจากใบหม่อนโดยใช้ลำดับกรดอะมิโนของ MLL ที่ได้จากการโคลนยีน และศึกษา binding site ของ MLL พบว่าเกิดจากลำดับกรดอะมิโนที่อยู่บริเวณ loop 46-52, 76-82, 122-125 และ N-terminus ของ α -chain (Gly1) และข้อมูลจาก molecular dynamic simulations พบว่า MLL จับกับ N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกรดเซียลิกได้ดีกว่า N-acetyl-b-D-galactosamine (GalNAc) และ galactose (Gal) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับเลคตินที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ (Ratanapo *et al.*, 1998) และนอกจากนี้ได้ทำการแสดงออกยีนเลคตินจากใบหม่อนในเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรีย *Escherichia coli* BL21 (DE3) ให้ผลิตโปรตีนที่ต้องการและนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE-ion exchange และ Ni^{2+} -NTA affinity column chromatography และไม่พบ hemagglutination activity ของ recombinant MLL (Getsang, 2007)

6. พืชภายใต้ความเครียด

Larcher (2003) กล่าวว่าความเครียดในพืชคือการทำให้พืชอยู่ในสภาวะที่ถูกเบี่ยงเบนไปจากสภาวะที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิต ความเครียดทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงและตอบสนองในทุกอวัยวะของพืชในระดับเดียวกัน การเปลี่ยนแปลงและตอบสนองของพืชอาจเกิดขึ้นเพียงชั่วคราว แต่บางครั้งก็สามารถเกิดขึ้นได้อย่างถาวร ปัจจัยที่ทำให้เกิดความเครียดในพืชสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม คือ ความเครียดจากสิ่งมีชีวิต (biotic stress) และความเครียดจากสิ่งไม่มีชีวิต (abiotic stress)

6.1 ความเครียดจากสิ่งมีชีวิต สามารถแบ่งกลุ่มได้ 4 กลุ่มคือ

- ความเครียดที่เกิดจากพืช เช่น ความหนาแน่นของต้นพืช ความต้านทานโรคและพืชที่เป็นกาฝาก
- ความเครียดที่เกิดจากจุลินทรีย์ เช่น ไวรัส แบคทีเรียและรา
- ความเครียดที่เกิดจากสัตว์ เช่น การเลี้ยงปศุสัตว์และการเหยียบย่ำ
- ความเครียดที่เกิดจากคน เช่น มลภาวะ สารเคมีเกษตร การตัดดิน การเผาไฟ

6.2 ความเครียดจากสิ่งไม่มีชีวิต สามารถแบ่งกลุ่มได้ 5 กลุ่มดังนี้

- ความเครียดที่เกิดจากแสงอาทิตย์ เช่น การได้รับแสงสว่างมากหรือน้อยเกินไป และรังสีต่าง ๆ
- ความเครียดที่เกิดจากอุณหภูมิ เช่น ความเย็น ความร้อน
- ความเครียดที่เกิดจากน้ำ เช่น อากาศแห้ง ดินแห้ง และน้ำท่วม
- ความเครียดที่เกิดจากแก๊ส เช่น การขาดออกซิเจน และแก๊สจากภูเขาไฟ
- ความเครียดที่เกิดจากแร่ธาตุ เช่น การขาดแร่ธาตุ ความไม่สมดุลของแร่ธาตุ เกือบโลหะหนัก ความเป็นกรด และความเป็นเบส

การตอบสนองต่อความเครียดของพืชเมื่อมีความเครียดเกิดขึ้น เซลล์ของพืชจะมีการตอบสนองและปรับตัวต่อความเครียดที่เกิดขึ้นเพื่อความอยู่รอด ทุกครั้งที่มีความเครียดเกิดขึ้น พืชจะมีการตอบสนองในขั้นแรกโดยการแสดงออกของยีนจำเพาะต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด (specific stress-induced genes) ตามด้วยปฏิกิริยาที่จำเพาะทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของพืช ผลผลิตของยีนที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยความเครียดนี้สามารถแบ่งกลุ่มได้ 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ป้องกันและต่อต้านสิ่งแวดล้อมที่ทำให้เกิดความเครียด ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการป้องกันเซลล์จากการสูญเสียน้ำ เช่น เอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับสังเคราะห์สารในกลุ่ม osmoprotectants, late embryogenesis abundant (LEA) proteins, antifreeze proteins, chaperones และเอนไซม์ที่ช่วยในการกำจัดพิษ (detoxification) ส่วนกลุ่มที่สองคือกลุ่มที่ควบคุมการแสดงออกของยีนและการส่งสัญญาณในการตอบสนองต่อความเครียด ประกอบด้วย transcription factor, protein kinase และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสันดาปของฟอสโฟอินโนซิไทด์ (Hirt, 2004)

7. ดินเค็ม

ดินเค็ม (saline soil) หมายถึง ดินที่มีปริมาณเกลือที่ละลายอยู่ในดินมากเกินไปจนมีผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืช ทำให้ผลผลิตของพืชลดลง ทั้งนี้เนื่องจากความเค็มทำให้พืชเกิดอาการขาดน้ำและมีการสะสมไอออนของพืชมากเกินไป นอกจากนี้แล้วยังทำให้เกิดความสมดุลของธาตุอาหารพืชด้วย (สมศรี, 2539) การตรวจสอบว่าดินบริเวณใดเป็นดินเค็มนั้นทำได้โดยการนำไปวัดค่าการนำไฟฟ้า (electrical conductivity) ของสารละลายในดินที่อิ่มตัวด้วยน้ำ (saturation extract) ที่อุณหภูมิ 25 °C ซึ่งจะมีค่าสูงกว่า 4 เดซิซิเมนต่อเมตร (dS/m) เกลือที่สามารถละลายน้ำได้ดินนั้นมีอยู่หลายชนิด ส่วนใหญ่จะเป็นเกลือของ โซเดียม แคลเซียม โพแทสเซียม โดยจะอยู่ในรูป คลอไรด์ ซัลเฟต คาร์บอเนต และ ไนเตรต ค่าที่ได้จากการวัดการนำไฟฟ้าของสารละลายดินนั้นสามารถนำมาใช้ประเมินปริมาณเกลือและอิทธิพลของเกลือในดินต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืช

ปัจจุบันปัญหาดินเค็มเกิดพบเพิ่มขึ้นในส่วนต่างๆของโลก พบว่ากว่า 10% ของพื้นที่ทำการเกษตรมีปัญหาดินเค็มโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณอากาศร้อนชื้น ปัจจุบันนี้พื้นที่เกษตรชลประทานในโลกเกิดปัญหาดินเค็มเพิ่มปีละ 10 ล้านเฮกตาร์ ประเทศไทยก็ประสบปัญหานี้เช่นกัน โดยเฉพาะพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งมีการปลูกหม่อนเลี้ยงไหมมากที่สุดในประเทศและมีดินเค็มประมาณ 17.8 ล้านไร่ หรือคิดเป็นร้อยละ 17 ของพื้นที่ภาค และยังมีพื้นที่ที่มีโอกาสจะเป็นดินเค็มอีกประมาณ 19.4 ล้านไร่ นอกจากนั้นก็ยังมีความเสี่ยงที่ปลูกข้าว ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าดินเค็มจะทำให้ผลผลิตลดลง เนื่องจากเกิดความเป็นพิษของไอออน เกิดแรงดันออสโมติก หรือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพของดิน ยิ่งไปกว่านั้นหากพืชไม่สามารถเจริญเติบโตได้ก็จะเกิดความแห้งแล้งแพร่กระจายเพิ่มขึ้นได้ นอกจากนั้นก็พบว่ามนุษย์เป็นตัวการสำคัญในการก่อให้เกิดดินเค็ม แต่จากรายงานของกรมพัฒนาที่ดินพบว่า การปลูกป่าจะสามารถลดปัญหาดินเค็มลงได้ (Lanka, 2001)

ตารางที่ 1 การตอบสนองต่อระดับความเค็มของพืชโดยทั่วไป

ECE (dS/m)	เกลือในดิน (%)	ระดับความเค็มของดิน	อิทธิพลต่อพืช
2	< 0.1	ไม่เค็ม	ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืช
2-4	0.1-0.2	เค็มเล็กน้อย	มีผลต่อพืชที่ไม่ทนเค็ม
4-8	0.2-0.4	เค็มปานกลาง	มีผลต่อพืชหลายชนิด
8-16	0.4-0.8	เค็มมาก	พืชทนเค็มเท่านั้นที่ยังเจริญเติบโตได้ดี
16	> 0.8	เค็มจัด	พืชทนเค็มน้อยชนิดและพืชที่ใช้เกลือในการเจริญเติบโตเท่านั้นที่เจริญเติบโตได้ดี

ที่มา: United States Salinity Laboratory Staff (1954)

ตารางที่ 2 การคัดเลือกปลูกพืชในดินเค็ม

ค่าการนำไฟฟ้า (dS/m)						
2 - 4		4 - 8			8 - 16	
เค็มน้อย		เค็มปานกลาง			เค็มมาก	
ถั่วฝักยาว	ผักกาด	บวบ	กะหล่ำดอก	ผักโขม	ชะคราม	หนามแดง
คื่นฉ่าย	พริกไทย	น้ำเต้า	กะหล่ำปลี	พริกขี้หนู	คะน้า	หน่อไม้ฝรั่ง
แตงร้าน	แตงไทย	องุ่น	หอมใหญ่	มะเขือเทศ	กะเพรา	สะเม็ด
		ผักชี	ผักกาดหอม	ผักกาดหัว	ผักบุ้งจีน	ชะอม
		ถั่วพุ่ม	กระเทียม	หอมแดง	โก๋งกวาง	แส้ม
		แตงโม	แคนตาลูป	สับปะรด		
		มันฝรั่ง	ถั่วลิ้นเตา	ข้าวโพดหวาน		
เขยปีร่า		กุหลาบ			บานบุรี	คุณนายตื่นสาย
					เล็บมือนาง	บานไม่รู้โรย
					เจียวหมื่นปี	แพรวเซียงไฮ้
					เฟื่องฟ้า	ชบา เข็ม
ถั่วเขียว	ถั่วเหลือง	ข้าว	โสนอินเดีย	ฝ้าย	หญ้านวลน้อย	
ถั่วลิสง	ถั่วแดง	ป่าน	โสนพื้นเมือง	โสนคางคก	หญ้าแพรก	
ถั่วแขก	ถั่วดำ	ทานตะวัน	ปอแก้ว	โสนอัฟริกัน	หญ้าแห้วหมู	
ถั่วปากอ้า	งา	ข้าวโพด	หม่อน	ข้าวทนเค็ม	หญ้ากีนี	
		ข้าวฟ่าง	หญ้าเจ้าชู้	คำฝอย	หญ้าชันอากาศ	
		ถั่วอัญชัน	มันสำปะหลัง	มันเทศ	ป่านศรนารายณ์	
		ถั่วกำพร้าว้า		หญ้าขน	หญ้าไฮบริดเนเปียร์	
อาโวคาโด	กล้วย	ทับทิม	ปาล์มน้ำมัน	จีเห่ล็ก	ละมุด	ฝรั่ง
ลิ้นจี่	มะนาว	ชมพู	มะกอก	พุทรา	มะยม	มะขาม
ส้ม	มะม่วง	แค		มะรุ้ม	มะพร้าว	สะเดา
				มะม่วงหิมพานต์	มะขามเทศ	

ที่มา: กลุ่มสื่อส่งเสริมการเกษตร ส่วนส่งเสริมการเกษตร สำนักพัฒนาการถ่ายทอดเทคโนโลยี (2549)

8. กลไกการตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือของพืช

ความเค็มของดินเป็นความเครียดหลักในพืชที่เกิดจากสิ่งไม่มีชีวิต ซึ่งส่งผลร้ายต่อการผลิตและคุณภาพของพืช ระดับความเข้มข้นของเกลือมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช คือจะควบคุมสารอาหาร โดยลดการดูดซึมฟอสฟอรัส โพแทสเซียม ไนเตรตและแคลเซียม ทำให้ไอออนเป็นพิษต่อเซลล์ และการดูดซึมน้ำ ดังรูปที่ 1 และ 2 ความเครียดจากเกลือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการสังเคราะห์โปรตีน เป็นไปได้ว่าอาจมีการถอดรหัสของยีนตัวใหม่ หรืออย่างน้อยที่สุดก็ทำให้ผลผลิตของยีนบางยีนเพิ่มขึ้นได้ (Hopkins, 1999) เมื่อพืชได้รับความเครียดจากความเค็ม (salt stress) พบว่าจะมีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ของพืชในหลายลักษณะ เช่น ในใบยูคาลิปตัส (*Eucalyptus globules*) เมื่อได้รับความเครียดจากความเค็มผลคือ ปากใบปิดทำให้การดูดซึ่มคาร์บอนไดออกไซด์จากภายนอกเข้าสู่เซลล์ไม่ได้มีผลทำให้การสังเคราะห์แสงลดลง (Loreto and Delfine, 2000) และยังพบว่าในผักขม (spinach) ก็มีลักษณะเช่นเดียวกัน (Robinson et al., 1983; Delfine et al., 1999) นอกจากนี้ยังมีผลต่อกิจกรรม (activity) และคุณสมบัติของเอนไซม์หลายชนิด (Greenway and Munns, 1980) เช่น ใน *Mesembryanthemum crystallinum* พบว่าเมื่อได้รับความเครียดจากความเค็มกิจกรรมของเอนไซม์ phosphoenolpyruvate carboxylase เพิ่มขึ้นจากตัวควบคุมสูงถึง 4 เท่า (Thomas et al., 1992) ผลของความเค็มที่มีต่อพืชในลักษณะดังกล่าวนี้จะทำให้พืชมีการเจริญที่ผิดปกติ และให้ผลผลิตลดลงไป หรือ บางครั้งอาจจะรุนแรงจนทำให้พืชตายได้ Walia (2005) พบว่าศึกษาในยีนที่มีการแสดงออกภายใต้สภาวะที่มีความเครียดจากเกลือในข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare* L.) ในระยะต้นอ่อน โดยใช้เทคนิค microarray พบว่ามีการตอบสนองอย่างเด่นชัดต่อเกลือในการเหนี่ยวนำยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดจัสโมนิค

พืชที่สามารถเจริญเติบโตในสภาพพื้นที่ที่เป็นดินเค็มได้นั้นจะต้องมีกลไกบางอย่างที่จะบรรเทาความเป็นพิษของเกลือได้ โดยพืชจะมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มเพื่อความอยู่รอด ในพืชแต่ละชนิดอาจจะมีกลไกในการตอบสนองที่แตกต่างกันไป ซึ่งอาจจะเป็นกลไกเดียวหรือ หลายๆกลไกรวมกันทำให้เกิดความสามารถในการปรับตัวของพืช พืชสามารถที่จะบรรเทาความเป็นพิษของเกลือโดยใช้กลไกต่างๆ แบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้ คือ การควบคุมสมดุลของไอออนและน้ำ การสะสมสารเมแทบอลิต์ (metabolite) เพื่อลดความเป็นพิษของ reactive oxygen species (ROS) และการควบคุมอัตราการเจริญเติบโต

ความทนเค็มของพืชมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของเกลือในดินและชนิดของพืชที่สามารถปรับตัวโดยใช้กลไกต่างๆ ที่หลากหลายทางชีวเคมีซึ่งประกอบด้วย (1) การสังเคราะห์สารพวก compatible solutes (2) ควบคุมการขนส่งไอออนจากรากไปยังใบ (3) การเก็บไอออนไว้เซลล์หรือแวคิวโอล (compartmentalization of ions) (4) การเลือกเก็บสะสมไอออน (exclusion of ions) (5) การสร้างเอนไซม์ต่อต้านการเกิดออกซิเดชัน (6) การสร้างฮอร์โมนพืช (Parida and Das, 2005)

8.1 การควบคุมสมดุลไอออน

พืชเมื่ออยู่ในสภาวะดินที่มีสารละลายของเกลือสูงจะมีการเคลื่อนย้ายไอออนของ Na^+ และ Cl^- หรือ ไอออนอื่นๆ เช่น K^+ และ Ca^{2+} ระหว่างสารละลายดินกับเซลล์พืช (Binzel *et al.*, 1988) การปรับสมดุลของ Na^+ และ Cl^- จะมีการปรับสมดุลใน apoplastic ในสภาวะสารละลายดินที่มีเกลือสูงทำให้ osmotic stress สูง เกิดสภาวะไอออนไม่สมดุลและเกิดความเป็นพิษ ทำให้พืชจำเป็นต้องสร้างสมดุลไอออนในเซลล์ เพื่อที่จะทำการปรับเปลี่ยนให้มีความเหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ และการเจริญเติบโตภายในเซลล์ เพื่อให้อยู่รอดในสภาวะดินเค็ม (Chesemann, 1988) การไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของไอออนที่ละลายอยู่ในดินนั้นอาจเกิดขึ้นเนื่องจากความต่างศักย์ของพลังงานเทอร์โมไดนามิก ความต่างศักย์ไฟฟ้า ความต่างศักย์ของ electrochemical gradient หรือ ความต่างของความเข้มข้นของสารละลาย (Nobel, 1991) การเคลื่อนที่ของไอออนโดยทั่วไปจะมีโปรตีนเป็นตัวควบคุมการเคลื่อนย้ายไอออนเช่น เป็นตัวปั๊ม (pump) เป็นพาหะ (carrier) และเป็นช่องให้ไอออนผ่านเข้าออก (channel) (Sussma และ Harper, 1989)

8.2 การลดความเป็นพิษของ Reactive oxygen species (ROS)

ROS คือผลผลิตของกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิต ในระบบของสิ่งมีชีวิตที่ใช้ออกซิเจนจะมีการสะสมและเคลื่อนย้าย ROS สำหรับในพืชกระบวนการสังเคราะห์แสงจะให้ผลผลิตของ ROS เพิ่มขึ้นและจะส่งผลให้เกิดออกซิเจนรูปแบบต่างๆ เช่น superoxide radical, hydrogen peroxide และ hydroxyl radical ซึ่งออกซิเจนรูปแบบต่างๆ ที่เกิดขึ้นนี้จะมีผลในการทำลายโปรตีนและการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในวัฏจักรเคลวิน (Kerb's cycle) เปลี่ยนเบสและน้ำตาลในสายดีเอ็นเอทำให้เกิดการแตกสลายของสายดีเอ็นเอ เกิด lipid peroxidation ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ในส่วนที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบถูกทำลายไปซึ่งจะส่งผลให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ได้ โดยทั่วไปในสภาวะปกติพืชจะมีระบบเอนไซม์

หลายชนิดที่ควบคุมกลไกเพื่อลดความเป็นพิษของ ROS เช่น superoxide dismutase, catalase, ascorbate และ glutathione (Cassells and Curry, 2001)

8.3 การสะสมสารออสโมไลต์

การตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือโดยการผลิตและสะสมสารที่อยู่ในกลุ่มของ osmoprotective compounds ที่รู้จักกันในชื่อ compatible solutes ซึ่งเป็นโมเลกุลของสารอินทรีย์ขนาดเล็กที่ไม่มีพิษต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม ประกอบด้วย proline, glycinebetaine, polyols, sugar alcohols และ soluble sugars โดยสาร osmolytes เหล่านี้จะช่วยรักษาสภาพของโปรตีนและโครงสร้างของเซลล์ และยังสามารถเพิ่มแรงดันออสโมติกในเซลล์ได้ด้วย (Yancey et al., 1982) glycinebetaine และ trehalose ทำหน้าที่รักษาโครงสร้างจตุรภูมิของโปรตีนและเชื่อมเซลล์แมนนิทอลช่วยกำจัดสารอนุมูลอิสระ ดังนั้นสารอินทรีย์เหล่านี้จึงได้ชื่อว่า osmoprotectants (Chen and Murata, 2000) เมื่อพืชอยู่ในสภาวะที่มีความเครียดจากความเค็มจะมีกลไกกระตุ้นให้มีการสร้างสารเพื่อรักษา osmotic pressure ของเซลล์ให้เหมาะสมโดยการสะสมสารออสโมไลต์ ได้แก่

- น้ำตาลละลายได้
- โปรตีนละลายได้
- กรดอะมิโน
- สารประกอบของแอมโมเนียม
- โพลีเอมีน
- โพลีอัลกอฮอล์

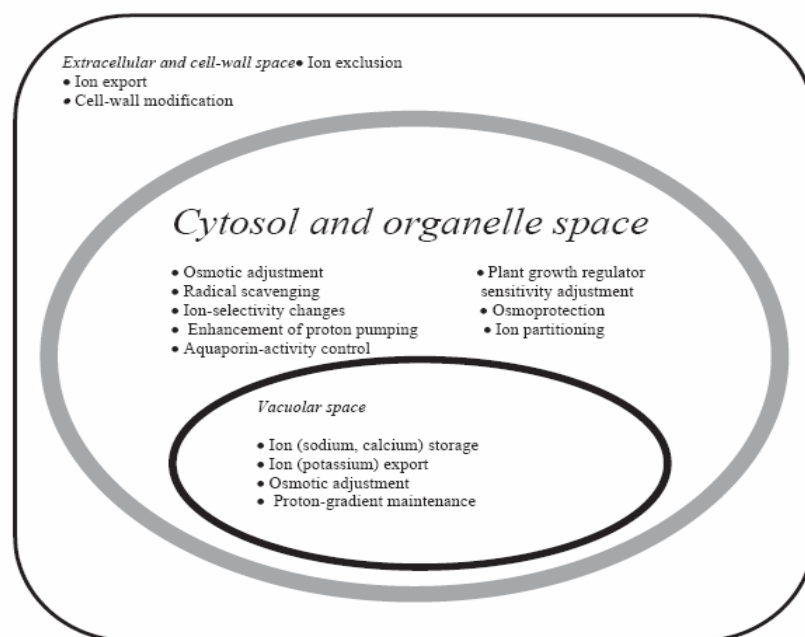
โพรลีนเป็นกรดอะมิโนที่เป็นสารประกอบไนโตรเจน สร้างขึ้นเมื่อพืชได้รับ osmotic stress จากความแห้งแล้งหรือความเค็ม โพรลีนมีหน้าที่ในการป้องกันเนื้อเยื่อไม่ได้รับอันตรายจากความเครียด โดยจะเก็บไว้ในรูปสารประกอบไนโตรเจน osmo-solute และป้องกันการเสียสภาพของเอนไซม์ และโครงสร้างของเซลล์ (Greenway and Munns, 1980) การสังเคราะห์โพรลีนมีสารตั้งต้นสองชนิด คือ glutamate และ ornithine การสะสมโพรลีนส่วนใหญ่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ใน glutamate pathway ดังนั้นจึงมีการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์และการสะสมโพรลีนเพื่อเป็นแนวทางในการนำไปปรับปรุงพันธุ์พืชทนเค็ม Kishor et al., (1995) ได้ศึกษาการเพิ่มและสะสมโพรลีนโดยทดสอบการแสดงออกของเอนไซม์ Pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CS) โดยจะตัดต่อยีนเข้ากับเวกเตอร์ Pbr 121 ภายใต้การควบคุมของ CaMV 35S promoter เข้าสู่

Agrobacterium tumefaciens แล้วทำการถ่ายยีนเข้าสู่ต้นยาสูบเพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ P5CS พบว่าต้นที่ได้รับยีนจะผลิตเอนไซม์มากขึ้น ทำให้การสังเคราะห์โพรลีนมากกว่าชุดควบคุม 10-18 เท่า นอกจากนี้การสะสมโพรลีนยังสามารถใช้เป็น marker ในการศึกษาสภาวะที่มีความเครียดจากความเค็ม เช่น ใน *M. crystallinum* โดยใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์ชักนำให้เกิดการสะสมโพรลีน พบว่ายังมีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นก็จะมีการสะสมโพรลีนมากขึ้นตามไปด้วย (Thomas *et al.*, 1992)

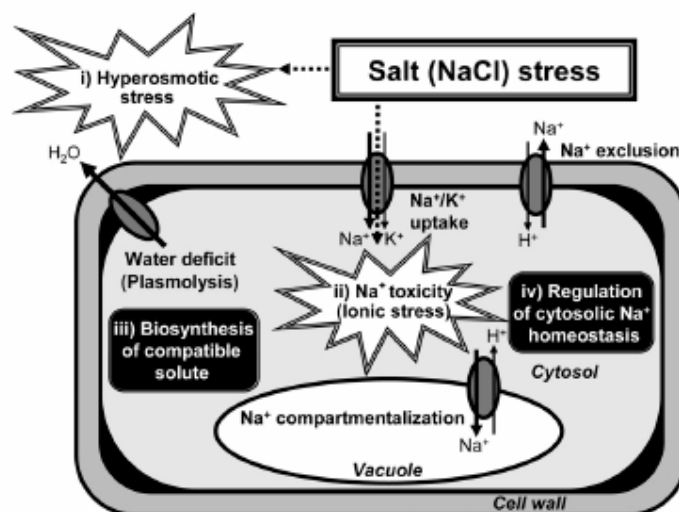
น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคสและฟรุกโตสสามารถปลดปล่อย (จาก starch และ fructans ได้ตามลำดับ) ในการตอบสนองต่อความเครียด และเมื่อความเครียดหายไปน้ำตาลเหล่านี้ก็สามารถกลับคืนสู่รูปเดิมได้ด้วยกระบวนการรีโพลีเมอไรส์ ในขณะที่แมนนิทอลเป็นรูปรีดิวซ์ของแมนโนส โดยจะมีความเข้มข้นของแมนโนสเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับความเครียด ในทางตรงกันข้าม ขณะที่มีการสะสมไกลซีนบีเทนและแมนนิทอลก็มีการควบคุมการใช้โดยลดอัตราการย่อยสลายและเผาผลาญแมนนิทอลลง (Buchana *e tal.*, 2002)

8.4 การควบคุมการเจริญเติบโต

เมื่อมีความเครียดเกิดขึ้น เซลล์ของพืชจะมีการตอบสนองและปรับตัวต่อความเครียดที่เกิดขึ้นเพื่อความอยู่รอด ทุกครั้งที่มีความเครียดเกิดขึ้น พืชจะมีการตอบสนองในขั้นแรกโดยการแสดงออกของยีนจำเพาะต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด (specific stress-induced genes) ตามด้วยปฏิกิริยาที่จำเพาะทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของพืช ผลผลิตของยีนที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยความเครียดนี้สามารถแบ่งกลุ่มได้ 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ป้องกันและต่อต้านสิ่งแวดล้อมที่ทำให้เกิดความเครียด ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการป้องกันเซลล์จากการสูญเสียน้ำ เช่น เอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับสังเคราะห์สารในกลุ่ม osmoprotectants, late-embryogenesis-abundant (LEA) proteins, antifreeze proteins, chaperones และเอนไซม์ที่ช่วยในการขจัดพิษ (detoxification) ส่วนกลุ่มที่สองคือกลุ่มที่ควบคุมการแสดงออกของยีนและการส่งสัญญาณในการตอบสนองต่อความเครียด ประกอบด้วย transcription factor, protein kinase และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสันดาปของฟอสโฟอินโนซิไทด์ (Hirt and Shinozaki, 2004)



ภาพที่ 1 แสดงไอออนที่มีการสะสมบริเวณภายในเซลล์ (ที่มา: Parida, 2005)



ภาพที่ 2 ความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ทำให้พืชที่ได้รับเกิดความเสียหายสองอย่าง คือ i) การขาดน้ำซึ่งไม่ได้เป็นผลโดยตรงแต่เกิดจาก hyperosmotic stress ii) การเกิด ionic stress ซึ่งเป็นผลโดยตรงที่เกิดจากความเป็นพิษของ Na⁺ ดังนั้นเพื่อให้เซลล์พืชมีความทนเค็มได้มากขึ้นจึงต้องใช้ 2 วิธีคือ iii) การผลิต compatible solute เพื่อเป็นสาร osmoprotectant และ iv) การควบคุมสมดุลของ Na⁺ ในไซโตซอลโดยใช้โปรตีนขนส่ง Na⁺ (Na⁺ transporting proteins) ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มแวคิวโอล (ที่มา: Hideki *et al.*, 2005)

9. เลคตินกับการตอบสนองต่อความเค็มจากเกลือ

Zhang *et al.* (2000) ได้ศึกษาเลคตินในข้าว (*Oryza sativa* L.) โดยใช้ความเครียดจากเกลือเหนี่ยวนำให้มีการเพิ่มปริมาณเลคติน พบว่าเลคตินที่ได้มี 2 isoform ที่มีความคล้ายคลึงกันมากคือ Orysata 1 และ Orysata 2 ทั้งสอง isoform ประกอบด้วย 2 subunits ที่มีขนาด 15 kDa จัดอยู่ในกลุ่ม mannose-specific jacalin-related lectins นอกจากนี้ยังพบว่าลำดับเบสทางด้าน N-terminal ของ Orysata 1 และ Orysata 2 มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของข้าวในฐานข้อมูล Genbank ที่ถอดรหัสเป็น salt-induced rice protein และ mannose-binding rice lectin (Genbank accession numbers AF001395 และ AB012605) ตามลำดับ

Hirano *et al.*, (2000) และ Zhang *et al.*, (2000) ได้พบหลักฐานที่แสดงให้เห็นว่าโปรตีน SALT มีการแสดงกิจกรรมของ mannose-binding lectin ต่อมา Goncalo *et al.*, (2003) จึงได้ศึกษา กิจกรรมของ SALT lectin ในข้าวว่าเลคตินมีบทบาทต่อโปรตีน SALT ในการตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือหรือไม่ และพบว่าระดับการแสดงออกของโปรตีน SALT และความไวในการตอบสนองต่อความเครียดไม่มีความสัมพันธ์กัน ซึ่งสรุปได้ว่าการแสดงออกของโปรตีน SALT ไม่ได้ถูกจำกัดในการตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือเพียงอย่างเดียว

10. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับกลไกการทนเค็มในพืช

พืชใช้วิธีการต่างๆ ในการปรับตัวให้ตอบสนองต่อความเครียดที่เกิดจากสิ่งไม่มีชีวิต เช่น ความเครียดจากเกลือที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืช ในการต้านทานความเค็มของพืช พืชมีกลไกการปรับตัวให้เข้ากับ ความเครียดจากเกลือที่แตกต่างกัน คือทางด้าน morphological และรูปแบบการพัฒนา เช่นทางสรีรศาสตร์และกระบวนการทางชีวเคมี การปรับตัวต่อความเครียดนี้ ต้องอาศัยการร่วมกันทำงานของสารเมแทบอลิต์ต่างๆ หลายชนิดที่มีการสะสมในรูปของ สารอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ เช่น sugar, proline, betaines และ polyol (Flowers *et al.*, 1977) polyol ในพืชอยู่ในรูปของ acyclic forms ซึ่งได้แก่ mannitol, glycerol, sorbitol, ononitol, pinitol และ cyclic (cyclitols) forms โดยทั่วไปจะมีการสะสม polyol ไว้ในไซโทพลาซึมเพิ่มรักษาสมดุล ออสโมติกเมื่อมีความเข้มข้นของไอออนของสารอนินทรีย์ในแวคิวโอลมากขึ้น นอกจากนี้ polyol ยังทำหน้าที่ในการกำจัดออกซิเจนอิสระ (oxygen radical scavenger) อีกด้วย (Ashraf and Harris, 2004) การสะสมของน้ำตาลละลายน้ำได้ (ซูโครส, กลูโคส และฟรุคโตส) มีความสัมพันธ์กับการ

ทนเค็มในพืช (Crowe *et al.*, 1993) และแพร่กระจายไปยังส่วนต่างๆ ของพืช โดยสะสมไว้ในใบ หั่ว รากและเมล็ด น้ำตาลจะช่วยป้องกันเซลล์ในระหว่างที่ได้รับความเครียดจากเกลือโดยใช้ 2 กลไก คือ หมู่ไฮดรอกซิลของน้ำตาลจะไปแทนที่น้ำในการรักษา hydrophilic interaction ที่ผนัง เซลล์และโปรตีนระหว่างที่เกิดการสูญเสียน้ำ โดยน้ำตาลจะสร้างพันธะไฮโดรเจนกับเมมเบรนและ โปรตีน เพื่อป้องกันการเสียสภาพของโปรตีน (Williams and Leopold, 1989) ส่วนอีกกลไกคือ น้ำตาลจะเป็นตัวหลักที่ทำให้เกิดการกลายเป็นแก้ว (vitrification) ซึ่งเกิดจากการรวมตัวเป็นกลุ่ม ของเซลล์ที่สูญเสียน้ำในไซโทพลาซึม น้ำตาลโดยเฉพาะซูโครสจะสะสมในเมล็ดและเรณู ส่วน น้ำตาลอื่น เช่น กลูโคสจะเป็นชั้นสเตรตที่สำคัญในปฏิกิริยาการหายใจของเซลล์ นอกจากนั้นยังช่วย สนับสนุนการหายใจและการขนส่งอิเล็กตรอน ฟรุกเตนนอกจากเป็นคาร์โบไฮเดรตสะสมแล้วยังมี หน้าที่เหนียวน้ำในกระบวนการเมแทบอลิซึมเมื่อมีความเครียดเกิดขึ้น และการผลิตคาร์โบไฮเดรต เพื่อตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือของพืชแต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไปดังตารางที่ 3

การควบคุมการขนส่งไอออนเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการตอบสนองต่อความเครียดจาก เกลือของพืช พืชแต่ละชนิดจะมีการตอบสนองต่อความเครียดแตกต่างกันดังตารางที่ 4 โดยโปรตีน ที่เชื่อมเซลล์มีหน้าที่ในการคัดเลือกไอออนที่ผ่านเข้าออกจากเซลล์ Dupont (1992) ได้บันทึก เกี่ยวกับเชื่อมโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการคัดเลือกไอออนบวก โปรตีนดังกล่าวได้แก่ (1) $H^+-ATPase$ (2) Na^+/H^+ antiports ในพลาสมาเมมเบรนสำหรับปั๊ม Na^+ ที่มากเกินไปออกจากเซลล์ (3) Na^+/H^+ antiports ใน tonoplast สำหรับส่ง Na^+ เข้าไปในเก็บในแวคิวโอล (4) cation channels จะ เลือกให้ K^+ ผ่านเข้าสู่เซลล์มากกว่า Na^+ การศึกษากิจกรรมของ $H^+-ATPase$ ของพืชหลายชนิด (ตารางที่ 4) พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นและลดลงแตกต่างกัน Parihar *et al.* (1990) พบว่า *Trifolium alexandrinum* ในพันธุ์ที่มีการสะสม Na^+ น้อยจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ ATPase สูงกว่า พันธุ์ที่มีการสะสม Na^+ มาก ส่วนในข้าวสาลีพบว่ากิจกรรมของ plasma membrane-ATPase (PM-ATPase) ที่ใบเพิ่มสูงขึ้นในพันธุ์ที่ทนเค็ม และลดลงในพันธุ์ที่ไม่ทนเค็ม (Ayala *et al.*, 1997) ซึ่ง ตรงกันข้ามกับรากที่มีกิจกรรมของ PM-ATPase เพิ่มขึ้นในพันธุ์ที่ไม่ทนเค็ม แต่ลดลงในพันธุ์ที่ทน เค็ม ส่วนกิจกรรมของ V-ATPase (vacuole-ATPase) ในใบและรากไม่มีความแตกต่างกันในระหว่าง พันธุ์ทนเค็มและไม่ทนเค็ม และผลที่ได้นี้ยังเหมือนกับแครอทและถั่วเขียวอีกด้วย

เมื่อมีความเครียดเกิดขึ้นจะทำให้พืชมีการสร้าง active oxygen species เช่น superoxide (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical (OH) และ singlet oxygen (1O_2) ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ แต่พืชจะมีความสามารถในการกำจัดโดยอาศัยกลไกของ antioxidant ซึ่งมีทั้งแบบที่ใช้เอนไซม์และไม่ใช้เอนไซม์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลไกของ antioxidant ในข้าวพันธุ์ทนเค็มและไม่ทนเค็ม พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ลดลง แต่กิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase เพิ่มขึ้นในพันธุ์ไม่ทนเค็ม (Dionisiosese and Tobita, 1998) Turhan *et al.* (2008) ได้ศึกษากิจกรรมของออกซิเดทิฟเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทนเค็ม คือ catalase, ascorbate peroxidase และ glutathione reductase ในสตรอเบอร์รี่ 3 สายพันธุ์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ catalase ลดลงเฉพาะในพันธุ์ Tioga ในขณะที่อีกสองพันธุ์คือ Camarosa และ Chandler มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก แต่จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ เมื่อเวลาเพิ่มขึ้น โดยในวันที่ 30 ที่ความเข้มข้นเกลือ 34 มิลลิโมลาร์ พันธุ์ Camarosa มีกิจกรรมของเอนไซม์ catalase เพิ่มขึ้น 3 เท่า ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ ascorbate peroxidase ในพันธุ์ Camarosa จะเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน (5 เท่า) ในวันที่ 30 ที่ความเข้มข้นเกลือ 17 มิลลิโมลาร์ พันธุ์ Tioga เพิ่มขึ้น 10 เท่าที่ความเข้มข้นเกลือ 8.5 มิลลิโมลาร์ และพันธุ์ Chandler เพิ่มขึ้น 6 เท่าที่ความเข้มข้นเกลือ 34 มิลลิโมลาร์ แต่กิจกรรมของเอนไซม์ glutathione reductase มีเพียงพันธุ์ Camarosa เท่านั้นที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน (10 และ 8 เท่าที่ความเข้มข้นเกลือ 17 และ 34 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสตรอเบอร์รี่พันธุ์ Camarosa และ Tioga เป็นพันธุ์ที่ทนเค็มโดยดูจากพฤติกรรมการควบคุมการปิดเปิดของปากใบ ความสามารถในการทนอยู่ในสภาวะที่มีความเครียดจากเกลือสูงและกิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ ส่วนในหม่อน (*M. alba* L.)

Walia (2005) พบว่าศึกษาขึ้นที่มีการแสดงออกภายใต้สภาวะที่มีความเครียดจากเกลือในข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare* L.) ในระยะต้นอ่อน โดยใช้เทคนิค microarray พบว่ามีการตอบสนองต่อเกลืออย่างชัดเจนในการเหนี่ยวนำยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดจัสโมนิก

ตารางที่ 3 การเปลี่ยนแปลงของคาร์โบไฮเดรตในการตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือของพืช

Species	การตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือ
<i>Vitis vinifera</i>	ซูโครสและแป้งลดลง reducing sugar เพิ่มขึ้น
<i>Cenchrus pennisetiformis</i>	ซูโครสลดลง กลูโคสและฟรุกโตสเพิ่มขึ้น
<i>Hordeum vulgare</i>	ซูโครสเพิ่มขึ้น reducing sugar ไม่เปลี่ยนแปลง
<i>Zygophyllum album</i>	ซูโครส กลูโคสและฟรุกโตสเพิ่มขึ้น
<i>Glycine max</i>	ซูโครสเพิ่มขึ้น แป้งลดลง
<i>Lepidium crassifolium</i>	Soluble sugar เพิ่มขึ้น

ที่มา: Ashraf and Harris (2004)

ตารางที่ 4 ผลของความเครียดจากเกลือต่อกิจกรรมของ plasma membrane H^+ -ATPase ในพืช

Species	การตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือ
<i>Pisum sativum</i> (cultured cell)	เพิ่มขึ้น
<i>Atriplex nummularia</i> (ใบ)	เพิ่มขึ้น
<i>Zea mays</i> (ใบ)	เพิ่มขึ้น
<i>Vigna radiata</i> (ราก)	เพิ่มขึ้น
<i>Citrus sinensis</i> (ราก)	เพิ่มขึ้น
<i>Hordeum vulgare</i> (ใบ)	เพิ่มขึ้น
<i>Triticum aestivum</i>	
ราก: พันธุ์ทนเค็มและไม่ทนเค็ม	ลดลง
ใบ: พันธุ์ทนเค็ม	เพิ่มขึ้น
ใบ: พันธุ์ไม่ทนเค็ม	ลดลง
<i>Arachis hypogaea</i>	ลดลง
<i>Lycopersicon esculentum</i>	
ราก	ลดลง
ใบ	ลดลง
<i>Buchloe dactyloides</i> (ราก)	ลดลง
<i>Gossypium hirsutum</i> (ราก)	เพิ่มขึ้น

ที่มา: Ashraf and Harris (2004)

11. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับกลไกการทนเค็มในหม่อน

Taiz and Zeiger (1991) พบว่ามีการสะสมของโพลีเปปไทด์ในระดับที่สูงในอาหารที่เลี้ยงเซลล์ tobacco (*Nicotiana tabacum*) ที่มีความเข้มข้นของ NaCl สูง

Tewary *et al.*, (2000) ศึกษาการตอบสนองของหม่อนที่ทนต่อเกลือและ osmotic stress ในหม่อน 3 สายพันธุ์ (*M. indica* L.) โดยเปรียบเทียบกับหม่อนพันธุ์ทนเค็ม (S34) และพันธุ์ทนแล้ง (S13) และพบว่าใน G4 มีการแตกหน่อ และมีความสูงเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ S34 เมื่อได้รับเกลือ NaCl สูงขึ้นจนถึง 1 % ในส่วนของการทนแล้งก็พบว่ามีการเปอร์เซ็นต์การแตกยอดและสูงเพิ่มขึ้นเช่นกัน

Sudhakar *et al.*, (2001) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของออกซิเดทิฟเอนไซม์ในหม่อนเช่น peroxidase, catalase, superoxide dismutase, glutathione reductase และ glutathione-S-transferase 2 สายพันธุ์คือ S1 และ ATP ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ทนเค็มและไม่ทนเค็มตามลำดับภายใต้ความเครียดจากเกลือ พบว่าเมื่อหม่อนได้รับความเครียดจากเกลือจะมีการเปลี่ยนแปลงของออกซิเดทิฟเอนไซม์เช่นในวันที่ 12 เมื่อได้รับความเครียดจากเกลือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กิจกรรมของเอนไซม์ glutathione reductase ในพันธุ์ S1 เพิ่มขึ้น 14 เท่า ส่วนพันธุ์ ATP เพิ่มขึ้น 9 เท่า ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ glutathione-S-transferase ในพันธุ์ S1 เพิ่มขึ้น 16 เท่า ส่วนพันธุ์ ATP เพิ่มขึ้น 13 เท่า นอกจากนี้ยังพบว่ามีการทำงานของ lipid peroxidase เพิ่มขึ้นในพันธุ์ ATP ในขณะที่พันธุ์ S1 กลับไม่มีการเปลี่ยนแปลง แสดงว่าใน S1 ซึ่งเป็นพันธุ์ทนเค็มมีการรักษาสภาพของเซลล์เมมเบรนไว้ได้

Vijayan *et al.* (2003) ได้คัดเลือกพันธุ์หม่อนทนเค็มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS โดยใช้เกลือ NaCl ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของต้นและราก โดยพบว่าเกลือสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการพัฒนาทั้งต้นและราก โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดจาก 83.7 % ของชุดควบคุม ลดลงเหลือ 6.1 % ใน 1 % NaCl จากหม่อนทั้งหมด 63 พันธุ์ มีเพียง 7 พันธุ์เท่านั้นที่สามารถเจริญได้ใน 0.3 % NaCl

Kumar *et al.* (2003) ได้ศึกษาผลของความเครียดจากเกลือต่อการสะสมของโพรลีนในหม่อนพันธุ์ทนเค็มกับไม่ทนเค็ม พบว่าการสะสมของโพรลีนที่ใบในวันที่ 12 เมื่อได้รับความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1.5 % พันธุ์ที่ทนเค็มมีการสะสมโพรลีนเพิ่มขึ้น 6 เท่า ในขณะที่พันธุ์ที่ไม่ทนเค็มมีการสะสมโพรลีนเพิ่มขึ้น 4 เท่า และพบกิจกรรมของเอนไซม์ pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR) ในพันธุ์ที่ทนเค็มเพิ่มสูงขึ้น 4 เท่า มากกว่าพันธุ์ที่ไม่ทนเค็มที่เพิ่มขึ้น 3 เท่า ในขณะที่เอนไซม์ proline oxidase และ proline dehydrogenase จะถูกยับยั้ง โดยในพันธุ์ที่ทนเค็มกิจกรรมของเอนไซม์ proline oxidase และ proline dehydrogenase ถูกยับยั้ง 16.88 และ 12.09 % ตามลำดับ ส่วนพันธุ์ที่ไม่ทนเค็มกิจกรรมของเอนไซม์ proline oxidase และ proline dehydrogenase ถูกยับยั้ง 35.29 และ 26.42 % ตามลำดับ

Harinasut *et al.* (2003) ศึกษาผลของความเค็มต่อเอนไซม์ที่ต่อต้านการเกิดออกซิเดชันในหม่อนพันธุ์ฝู โดยพบว่าความเครียดจากเกลือสามารถเหนี่ยวนำให้มีการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ที่ต่อต้านการเกิดออกซิเดชันคือ peroxidase, superoxide dismutase, ascorbate peroxidase และ glutathione reductase ได้โดยใช้ความเข้มข้นเกลือสูงสุด 150 mM นาน 12 วัน และพบว่ามีการสะสมของโพรลีนเพิ่มขึ้น 11 เท่า (Harinasut *et al.*, 2000)

กลไกในการตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือของพืชโดยทั่วไปจะทำให้การเจริญเติบโตของพืชลดลง ทำให้เกิดไอออนที่เป็นพิษ (Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-}) และเกิดความเครียดจากการขาดน้ำ (osmotic stress) สารอาหารและสมดุลของกระบวนการเผาผลาญ (Zhu, 2002) และเมื่อเกิดการขาดน้ำก็จะทำให้ปากใบปิด กระบวนการหายใจและการสังเคราะห์แสงลดลงจนเกิด oxidative stress ตามมาในที่สุด (Giridarakumer *et al.*, 1999) การปิดปากใบมีผลทำให้ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ในคลอโรพลาสต์ลดลงและทำให้ NADP^+ จับกับอิเล็กตรอนจาก PS I ได้น้อยลง ดังนั้นจึงทำให้ออกซิเจนที่สร้างขึ้นพร้อมกันเพื่อมารับอิเล็กตรอนเกิดเป็น reactive oxygen species (ROS) ซึ่งประกอบด้วย superoxide radicals, hydrogen peroxide (H_2O_2) และ hydroxyl radicals ($\text{OH}^\cdot$) และ ROS นี้เองที่ทำให้เกิด oxidative damage ขึ้น โดยจะไปทำลายส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์ เช่น ผนังเมมเบรนที่เป็นไขมัน โปรตีน และกรดนิวคลีอิก (Halliwell and Gutteridge, 1986) เพื่อลดความเสียหายที่เกิดจาก oxidative damage พืชจะสร้าง antioxidants เช่น reduced glutathione (GSH) และเอนไซม์ต่างๆ เช่น superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), glutathione-S-transferase (GST) และ glutathione peroxidase (GPX) เพื่อกำจัด ROS ที่เกิดขึ้น (Hussain *et al.*, 2008) เอนไซม์ peroxidase พบได้มากมายในพืชชั้นสูงและมีหน้าที่สำคัญ โดยเป็นส่วนหนึ่งของเอนไซม์ป้องกันที่ทำงานเกี่ยวเนื่องกันในเซลล์ ช่วยขจัดสารพิษที่อยู่ในรูป activated oxygen โดยเอนไซม์ peroxidase จะช่วยกำจัด hydrogen peroxide ส่วนเอนไซม์ที่ช่วยในการขจัดสารพิษอีกชนิดคือ GST ซึ่งเชื่อมต่อโมเลกุลของตัวเองเข้ากับสารแปลกปลอมภายนอกเพื่อกำจัดออกนอกเซลล์ (Leaver *et al.*, 1992) โดย glutathione จะหน้าที่หลักในการป้องกันต่อต้านการเกิด oxidative stress โดยลดจำนวน H_2O_2 ที่เกิดขึ้น (Foyer and Halliwell, 1976) ดังภาพที่ 4 ถึงแม้ว่าการศึกษาเกี่ยวกับการสร้างและสะสมสาร osmoprotectants เป็นอย่างดียิ่งขาดความรู้เกี่ยวกับการส่งสัญญาณเป็นลำดับที่ไปควบคุมการสร้างสาร compatible solutes ในพืชอีกมาก ดังนั้นการศึกษายินที่เกี่ยวข้อกับความเครียดจากเกลือจึงน่าจะเป็นวิธีการหนึ่งที่จะทำให้เข้าใจถึงกลไกต่างๆ ในการตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือได้มากขึ้น ในพืชชั้นสูงจะมีการสังเคราะห์โพรลีนได้ 2 ทางที่แตกต่างกัน โดยทางแรกคือจะเปลี่ยนกลูตามัทเป็น Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate (P5C) โดยใช้เอนไซม์ pyrroline-5-carboxylase synthetase (P5CS) และ P5C จะถูกรีดิวซ์เป็นโพรลีนด้วยเอนไซม์ pyrroline-5-carboxylase reductase (P5CR) ส่วนอีกทางหนึ่ง ornithine จะถูกเปลี่ยนเป็น P5C โดยกระบวนการย้ายหมู่อะมิโนได้เป็นโพรลีน (Jenks and Hasegawa, 2005) ดังภาพที่ 5 และมีสาร osmolytes อีกหลายชนิดเช่น glycinebetaine, polyols, sugar alcohols และ soluble sugars นอกจากกลไกข้างต้นแล้วพืชยังมีกลไกในการรักษาสสมดุลของไอออนภายในเซลล์ เพื่อขจัดไอออนที่มีมากเกินไปออกจากเซลล์ เนื่องจากไอออนเหล่านั้นจะเป็นพิษต่อเซลล์ ดังภาพที่ 6

ดังนั้นการวิจัยในนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากลไกในการตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือของหม่อนน้อยดังกล่าวข้างต้น โดยเลือกศึกษากลไกที่แตกต่างกันในระดับยีน โปรตีน และเมแทบอลิต์ดังนี้

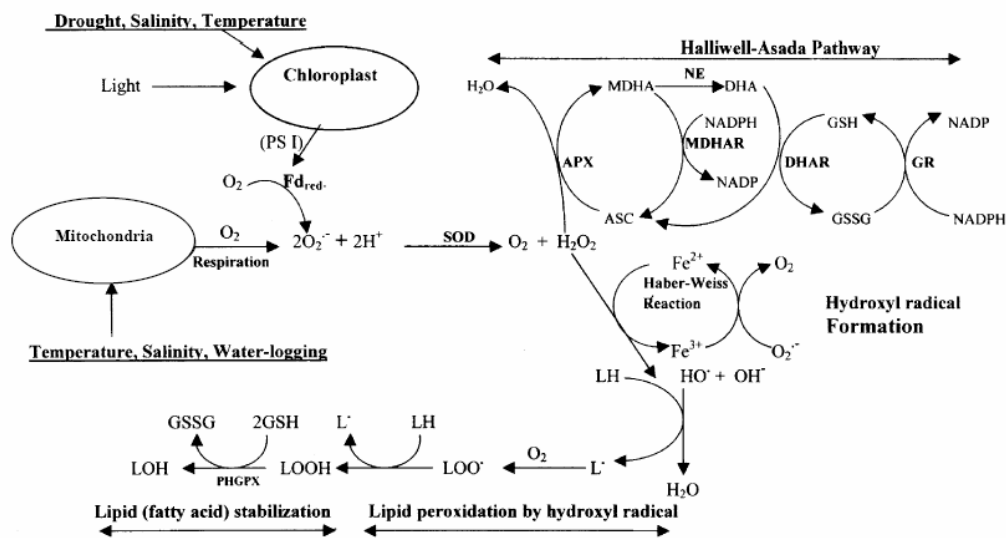
1. การศึกษาในระดับยีน เลือกยีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับ osmoprotection คือ

- Pyrroline-5-carboxylase synthetase gene (P5CS)
- Pyrroline-5-carboxylase reductase gene (P5CR)
- Fructose 1,6-bisphosphatase gene (FBP)
- Invertase gene (Inv)
- D-manital dehydrogenase gene (ManD)
- Betain aldehyde dehydrogenase gene (BADH)

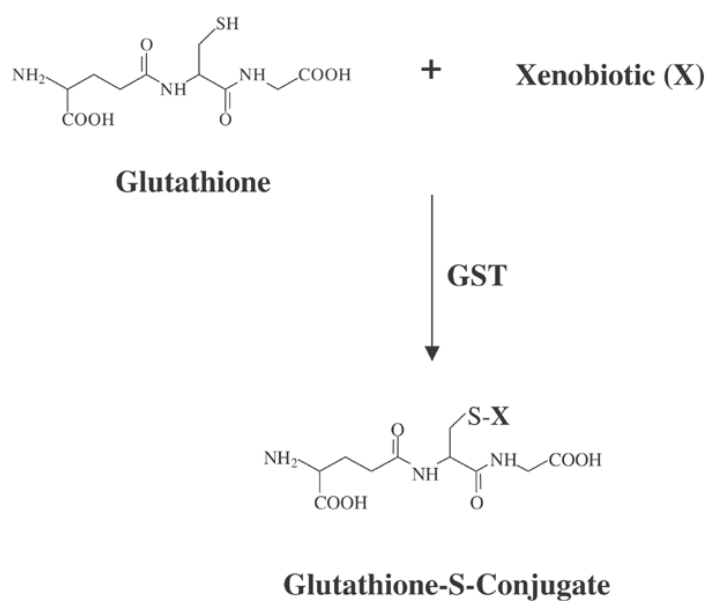
และยีนที่มีการตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือคือ MLL gene และ Putative late-embryogenesis-abundant (LEA) gene

2. การศึกษาในระดับโปรตีน เลือกเอนไซม์ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ antioxidation คือ peroxidase (PX) และ GST เกี่ยวข้องกับ osmoprotection คือ glucosidase และเกี่ยวกับไอออนปั๊มคือ ATPase

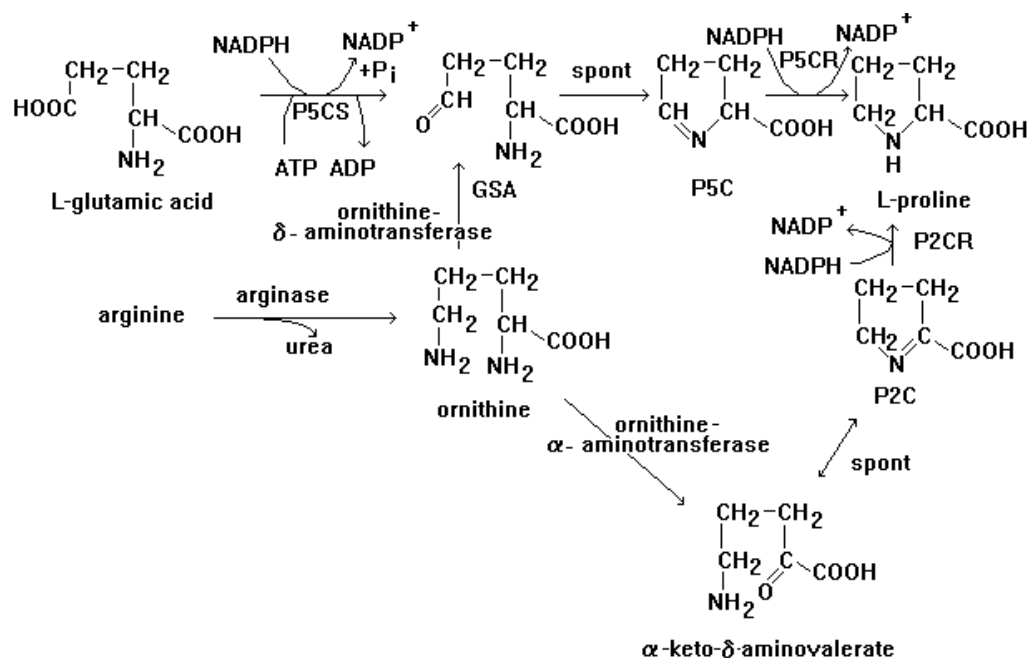
3. การศึกษาในระดับเมแทบอลิต์ เลือกวิเคราะห์น้ำตาล ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือคือ fructose, glucose, mannitol และ sucrose โดยมีความสัมพันธ์กันดังภาพที่ 6 และ 7



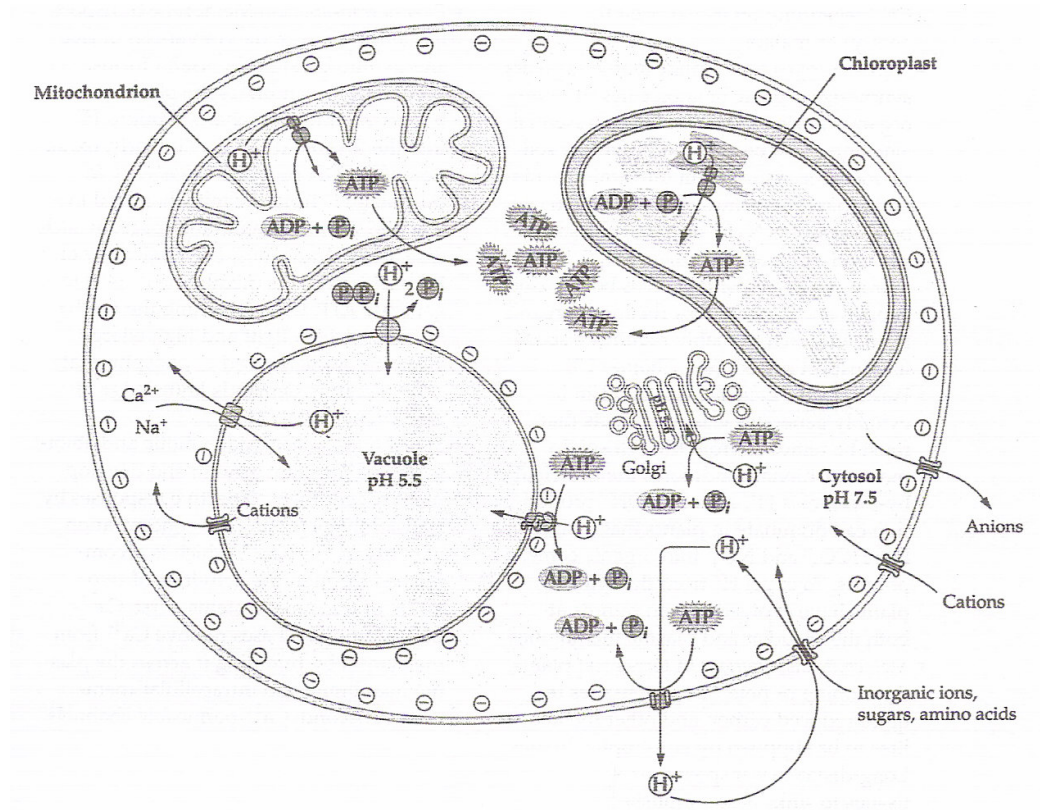
ภาพที่ 3 กลไกการกำจัด reactive oxygen species (ROS) ในเซลล์พืชโดยใช้และไม่ใช้เอนไซม์ ได้แก่ ascorbate peroxidase (APX), ascorbate (ASC), dehydroascorbate (DHA), dehydroascorbate reductase (DHAR), ferredoxin (Fd), glutathione reductase (GR), reduce glutathione (GSH), oxi-glutathione (GSSG), hydroxyl radical ($HO^{\cdot}$), lipid (LH), LOO ($L^{\cdot}$), LOOH, LOH, Monodehydro-ascorbate (MDHA), Mono dehydro-ascorbate reductase (MDHAR), Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPX) และ Superoxide dismutase (SOD) (ที่มา: Sairam and Tyagi, 2004)



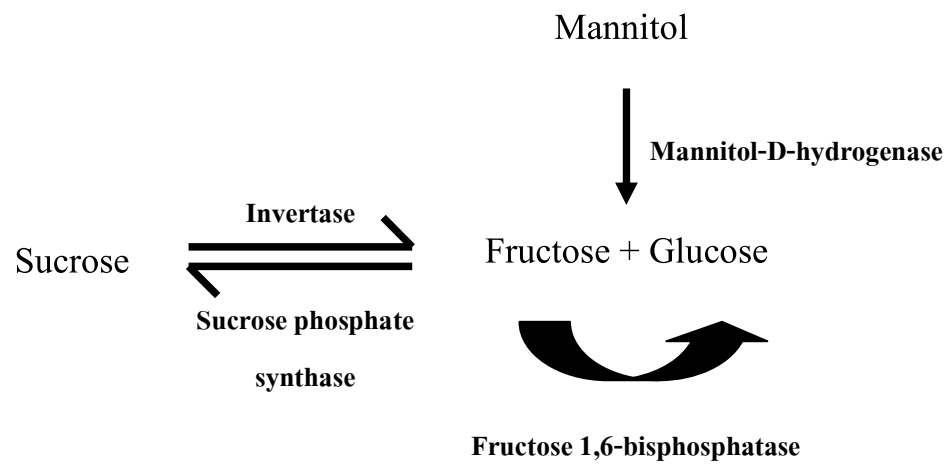
ภาพที่ 4 การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ Glutathione S-Transferase (GST) ในการกำจัดสารพิษออกนอกเซลล์



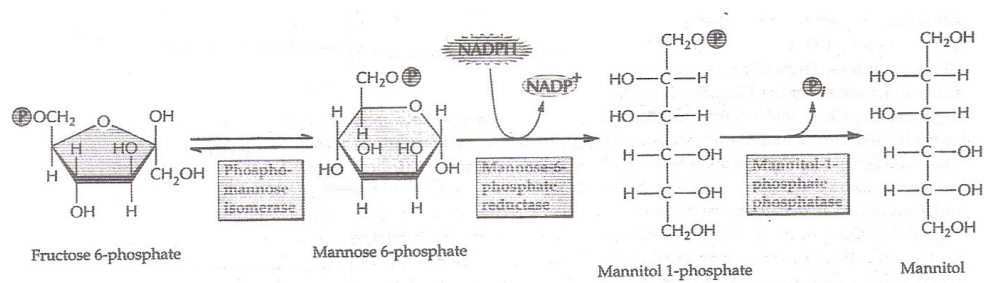
ภาพที่ 5 กลไกการผลิตและสลายของโพรลีนมี 2 ทางคือเปลี่ยนกลูตามัทเป็น Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate (P5C) โดยใช้เอนไซม์ pyrroline-5-carboxylase synthetase (P5CS) ได้เป็น glutamate semialdehyde (GSA) ซึ่งจะเปลี่ยนไปเป็น P5C ได้เอง และ P5C จะถูกรีดิวซ์เป็นโพรลีนด้วยเอนไซม์ pyrroline-5-carboxylase reductase (P5CR) ส่วนอีกทางหนึ่ง ornithine (Orn) จะถูกเปลี่ยนเป็น P5C ด้วยเอนไซม์ Orn-delta-aminotransferase โดยกระบวนการย้ายหมู่อะมิโนได้เป็นโพรลีน (ที่มา: Delauney and Verma, 1993)



ภาพที่ 6 กลไกการรักษาสมดุลไอออนในเซลล์พืช การปั๊มไอออนให้ผ่านเข้าออกทางเยื่อหุ้มเซลล์ โดยได้รับพลังงานจากการสลาย ATP ไปเป็น PP_i (ที่มา: Buchana *et al.*, 2002)



ภาพที่ 7 กลไกการสลายตัวของน้ำตาล 4 ชนิดที่สัมพันธ์กัน



ภาพที่ 8 กลไกการสังเคราะห์แมนนิทอลจากฟรุกโตส (ที่มา: Buchana *et al.*, 2002)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืช

หม่อนพันธุ์พื้นเมืองสายพันธุ์หม่อนน้อย (*M. rotundiloba* Koidz) ที่ปลูกในสภาวะปลอดเชื้อด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2. สารเคมี

สารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองเป็น molecular biology grade หรือ analytical grade

2.1 สารเคมีทั่วไป

Absolute ethanol, C₂H₅OH (Merck, Germany)

Dithiothreitol (DTT) (Pharmacia, USA)

Hydrochloric acid (HCl) (Merck, Germany)

Isopropanol (Merck, Germany)

Liquid nitrogen (TIG)

Polyvinylpyrrolidone (Sigma, USA)

Potassium chloride (Sigma, USA)

Sodium acetate (Merck, Germany)

Sodium chloride (Merck, Germany)

Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Merck, Germany)

Sodium hydroxide (BDH, UK)

2.2 สารเคมีสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Agar powder (HIMEDIA, India)
 Ammonium nitrate (Ajax, Australia)
 6-Benzylaminopurine (BAP)(ACROS, USA)
 Boric acid (Merck, Germany)
 Calcium chloride (Merck, Germany)
 Cobalt(II)chloride (APS, Australia)
 Copper(II)sulfate (Ajax, Australia)
 Glycine (Sigma, USA)
 Iron(II)sulfate (APS, Australia)
 Magnesium sulfate (Ajax, Australia)
 Maganese(II)sulfate (Ajax, Australia)
 Myo-inositol (Fluka, USA)
 Nicotinic acid (Himedia, India)
 Potassium dihydrogen orthophosphate (Carlo, Italy)
 Potassium iodide (Carlo, Italy)
 Potassium nitrate (APS, Australia)
 Pyridoxine hydrochloride (Himedia, India)
 Sodium molybdate (Ajax, Australia)
 Sucrose (Ajax, Australia)
 Thiamine hydrochloride (APS, Australia)
 Zinc sulfate (Ajax, Australia)

2.3 สารเคมีสำหรับการวัดกิจกรรมของเอนไซม์

Glutathione (GSH) (Fluka, USA)
 Guaiacol (Carlo erba, Italy)
 Hydrogen peroxide (H_2O_2)
 p-nitryophenyl-2-D-glucopyranoside (sigma, USA)
 Sodium carbonate (Na_2CO_3) (Ajax, Australia)
 Adenosinetriphosphate(ATP) (Fluka, USA)

Ammonium molybdate (Ajax, Australia)

Malachite green (Fluka, USA)

Perchloric acid (Fluka, USA)

Tween 20

2.4 สารเคมีสำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน

Agarose (Sekem, USA)

Chloroform (Merck, Germany)

Diethyl pyrocarbohydrate (DEPC)

dATP, dCTP, dGTP, and dTTP (Promega)

DNA marker : 100 bp + 1.5 Kb DNA plus ladder (Gibco,USA)

Ethanol, absolute (Merck, Germany)

Ethidium bromide (EtBr) (Sigma, USA)

Ethylene diamine tetraacetic acid, disodium salt dihydrate (EDTA)(Merck, Germany)

Immolase DNA polymerase (Bioline, USA)

Tris-(hydroxy methyl)-aminomethane (Sigma, USA)

2.5 ชุดสำเร็จรูปสำหรับการสกัด RNA

Reverse transcription system kit (Promega, USA)

TRIzol reagent (Gibco BRL, USA)

3. เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (Magnetic stirrer: Fisher scientific)

เครื่องชั่ง (Balance: Satorious)

เครื่องทำความร้อน (Hot plate: Fisher scientific)

เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermal cycle: Thermo hybrid)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV/Visible spectrophotometer: Beckman)

เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter): Denver Instrument model 215

เครื่องวิเคราะห์เจล (Gel-Documentation & analysis: Pharma Biotech)

เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge: Model Spectrafuge 16M)

เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมความเย็น (Refrigerated centrifuge: Jouan, USA)

เครื่องอ่านเพลต (Microplate reader: Molecular Devices)

ชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis unit: Submerged Agarose Gel Electrophoresis)

ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C (Freezer)

ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70°C (Freezer)

ตู้อบความร้อน (Hot air oven: Fisher Scientific)

ปิเปตต์อัตโนมัติ (Autopipette: Pipetteman, Gilson, France)

ไมโครเวฟ (Microwave: Turbora TRX-1980)

หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave: Model HA-300M)

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath: New Brunswick Scientific)

วิธีการ

1. การพัฒนาสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหม่อน

1.1 การเตรียมต้นหม่อนสำหรับการทดลอง

การเพาะเลี้ยงหม่อนน้อยในสภาวะปลอดเชื้อโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมง ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) อุณหภูมิ 25°C ความชื้นสัมพัทธ์ 70-80 % ในอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่มีฮอร์โมน BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เพื่อขยายพันธุ์หม่อน ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 120 มิลลิลิตร จำนวน 2 ต้นต่อขวด เมื่อหม่อนได้รับฮอร์โมน BAP หม่อนจะตอบสนองโดยการเร่งให้มีการแบ่งเซลล์ ทำให้มีการแตกยอดมากขึ้น จากนั้นจึงตัดยอดหม่อนไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่มีฮอร์โมน BAP เพื่อให้หม่อนเจริญเป็นต้นเดี่ยวและแตกราก เนื่องจากหม่อนจะดูดซึมสารอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโต จึงต้องทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 1 เดือน

1.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของหม่อน

1.2.1 การหาความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของหม่อน

หาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของหม่อน โดยใช้อาหารสูตร MS ที่มีฮอร์โมน BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีวุ้น 0.8 % และมีความเข้มข้นของน้ำตาลต่างกันไปตามลำดับคือ 1 %, 2 % และ 3 % จากนั้นวัดการเจริญเติบโตจากความสูงจำนวนใบและจำนวนยอดทุก 3 วัน

1.2.2 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตเมื่อนำน้ำตาลซูโครสกับน้ำตาลทรายห่อมิตรผล

เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของหม่อนเมื่อนำน้ำตาลซูโครสกับน้ำตาลทรายห่อมิตรผล ทำการทดลองเหมือนข้อ 1.2.1

1.2.3 การหาความเข้มข้นของฮอร์โมน BAP ที่เหมาะสมต่อการเร่งการแตกยอดหม่อน

หาความเข้มข้นของฮอร์โมน BAP ในอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของหม่อน โดยใช้อาหารสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 3 % มีวุ้น 0.8 % และมีความเข้มข้นของฮอร์โมน BAP ต่างกันไปตามลำดับคือ 0, 0.1, 0.25, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นวัดการเจริญเติบโตจากความสูง จำนวนใบและจำนวนยอดทุก 3 วัน

2. การทดสอบความเครียดของหม่อนในสถานะที่มีเกลือ

2.1 การเตรียมต้นหม่อนก่อนนำไปปลูกในสภาพที่มีเกลือความเข้มข้นต่างๆ กัน

นำต้นหม่อนมีอายุ 20 วัน สูงประมาณ 2 เซนติเมตร มีรากและใบประมาณ 3-5 ใบ ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 3 % วุ้น 0.8 % แต่ไม่มีฮอร์โมน BAP ย้ายมาปลูกในขวดขนาด 240 มิลลิลิตรที่บรรจุอาหารเหลวที่ไม่มีน้ำตาลซูโครส ฮอร์โมน BAP และวุ้น ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ซึ่งมีเวอร์มิคูไลท์ที่ปลอดเชื้อเป็นวัสดุจำรอง 10 กรัมผสมรวมอยู่ด้วย ทำการปรับสภาพหม่อนให้คุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมก่อนทำการทดลองในอาหารที่มีเกลือ 1 สัปดาห์

2.2 การหาระยะเวลาและลักษณะทางกายภาพของหม่อนเมื่อได้รับความเครียดจากเกลือ

นำต้นหม่อนที่ปรับสภาพแวดล้อมครบ 1 สัปดาห์มาเดิมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 100, 300, 500 และ 600 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นละ 5 ขวด ขวดละ 2 ต้น สังเกตและบันทึกความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในช่วงต่างๆ เพื่อศึกษาความทนเค็มในหม่อนว่าสามารถทนอยู่ในสถานะที่มีเกลือได้ที่มีความเข้มข้นสูงสุดคือ 600 มิลลิโมลาร์ได้นานกี่วัน

2.3 การเตรียมตัวอย่างหม่อนเพื่อศึกษากลไกการตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือ

นำต้นหม่อนที่ปรับสภาพแวดล้อมครบ 1 สัปดาห์มาเดิมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 100, 300, 500 และ 600 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นละ 5 ขวด ขวดละ 2 ต้น เมื่อเวลาผ่านไป 0, 1, 3, 6, 12, 24, 72, 120 และ 168 ชั่วโมง จึงเก็บตัวอย่างโดยตัดใบและราก นำมาล้างให้สะอาด จากนั้นแบ่งตัวอย่างเป็น 3 ส่วนสำหรับการสกัดเอนไซม์ การวิเคราะห์น้ำตาลและการสกัด RNA

ต่อไป ถ้ายังไม่ทำการทดลองในทันทีให้แช่ในไนโตรเจนเหลวเก็บที่ -70°C ส่วนตัวอย่างที่จะนำไปสกัด RNA ให้เติม 2 % SDS ลงไปก่อนแช่ไนโตรเจนเพื่อยับยั้งการสลายตัวของ RNA

3. การสกัดและวัดกิจกรรมของเอนไซม์

นำตัวอย่างใบและรากหม่อนที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 100, 300, 500 และ 600 มิลลิโมลาร์ แต่ละตัวอย่างน้ำหนักประมาณ 100 มิลลิกรัม บดให้ละเอียดใน 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 ที่มี 2 mM EDTA, 4 mM dithiothreitol (DTT) และ 6 มิลลิกรัม polyvinylpyrrolidone (PVP) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไป sonicate นาน 15 นาที เพื่อให้เซลล์แตกอย่างสมบูรณ์ และหมุนเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาทีเพื่อให้กากเซลล์ตกตะกอน เก็บของเหลวส่วนใสนำไปวัดปริมาณโปรตีนในสารละลายตามวิธีการของ Lowry *et al.* (1951) กำหนดความเข้มข้นของโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) (ภาคผนวก ข) และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดต่างๆ ดังนี้

3.1 ATPase

3.1.1 กิจกรรมของเอนไซม์ ATPase ทั้งหมดในเซลล์

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ATPase ตามวิธีของ Mahuren *et al.* (2001) โดยวัดปริมาณไอออนของฟอสเฟตที่เกิดขึ้นภายหลังการย่อย ATP ของเอนไซม์ ในการทดลองใช้สารละลายผสม (ชุดที่ 1 คูภาคผนวก ข ข้อ 2.1.2) ที่มี 3 mM ATP เป็นซับสเตรต ละลายใน 50 mM Tris-HCl buffer pH 6.5 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับ crude enzyme 5 ไมโครลิตร ใน 96-well plate บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที จึงเติม color reagent (ภาคผนวก ก) 200 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบปริมาณกับกราฟของสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตมาตรฐาน

3.1.2 กิจกรรมของเอนไซม์ ATPase แวกิวโอล

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ATPase ในแวกิวโอลใช้วิธีเดียวกับข้อ 3.1.1 แต่แตกต่างกันที่สารละลายผสม (ชุดที่ 2 ภาควงก ข ข้อ 2.1.3) จะเพิ่ม 100 mM potassium nitrate ลงในสารละลายด้วย เนื่องจาก potassium nitrate จะไปยับยั้งการทำงานของ ATPase ที่บริเวณผนังเมมเบรนของแวกิวโอล (P-ATPase) ดังนั้นเมื่อนำกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้นี้ไปหักลบออกจากกิจกรรมของเอนไซม์ ATPase ทั้งหมดในเซลล์ก็จะทำให้ทราบกิจกรรมของเอนไซม์ในแวกิวโอล

กำหนดให้ 1 U ของเอนไซม์ ATPase เท่ากับปริมาณของเอนไซม์ ATPase ที่สามารถย่อย ATP แล้วเกิดไอออนของฟอสเฟต 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

3.2 Glucosidase

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ glucosidase ตามวิธีของ Lyman *et al.* (1995) โดยวัดปริมาณ *p*-nitrophenol ที่เกิดขึ้นภายหลังการย่อยของเอนไซม์ ในการทดลองใช้ 1 mM *p*-nitrophenyl-2-D-glucopyranoside (PNPG) เป็นซับสเตรต (ภาควงก ก) ที่ละลายใน 50 mM sodium acetate buffer pH 5 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับ crude enzyme 5 ไมโครลิตร ใน 96-well plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 5 mM Na₂CO₃ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 นาโนเมตร ($\epsilon = 18.3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

กำหนดให้ 1 U ของเอนไซม์ glucosidase เท่ากับปริมาณของเอนไซม์ glucosidase ที่สามารถย่อย PNPG ไป 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

3.3 Glutathione-S-Transferase (GST)

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ GST ตามวิธีของ Bengt and Claes (1981) โดยวัดปริมาณ glutathione (GSH) ที่ลดลง ในการทดลองใช้สารละลายผสมที่มี 1mM 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB) เป็นซับสเตรต และ 1 mM GSH (ภาควงก ก) ที่ละลายใน 50 mM sodium phosphate buffer pH 7 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับ crude enzyme 5

ไมโครลิตร ใน 96-well plate วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร ($\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ที่เวลา 0, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 วินาที

กำหนดให้ 1 U ของเอนไซม์ GST เท่ากับปริมาณของเอนไซม์ GST ที่สามารถย่อย CDBN ไป 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

3.4 Peroxidase

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ตามวิธีของ Nakano and Asada (1981) โดยวัดปริมาณ H_2O_2 ที่ลดลง ในการทดลองใช้สารละลายผสมที่มี guaiacol เป็นซับสเตรต และ 1 mM H_2O_2 (ภาคผนวก ก) ที่ละลายในบัฟเฟอร์ที่ pH 5, 7 และ 10 (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับ crude enzyme 5 ไมโครลิตร ใน 96-well plate วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 436 นาโนเมตร ($\epsilon = 25.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ที่เวลา 0, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 วินาที

กำหนดให้ 1 U ของเอนไซม์ peroxidase เท่ากับปริมาณของเอนไซม์ peroxidase ที่สามารถย่อย guaiacol ไป 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

4. การวิเคราะห์น้ำตาลในหม่อนด้วยเทคนิค HPLC

นำตัวอย่างใบและรากหม่อนที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 100, 300, 500 และ 600 มิลลิโมลาร์ แต่ละตัวอย่างมีน้ำหนักประมาณ 50 มิลลิกรัม สกัดน้ำตาลโดยการบดให้ละเอียดในน้ำนาโนเพียว (nano pure water) 1 มิลลิลิตร กรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาลด้วยเทคนิค HPLC (Wilson *et al.*, 1982) โดยใช้เครื่อง HPLC ยี่ห้อ Water รุ่น 717 plus Autosampler (Rheodyne injector), Water 600 Controller (Pump model), Water 2414 Rid (Refractive index detector) และคอลัมน์ Hypersil APS-2 (5 ไมโครเมตร, 300 x 4.6 มิลลิเมตร) โดยใช้ 85% acetonitrile เป็นส่วนเคลื่อนที่ และมีอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 45 นาที

5. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับ RNA

การแยกและโคลนยีนจากสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอตนิยมโคลนจาก cDNA เพราะการใช้ genomic DNA ในสิ่งมีชีวิตพวกนี้มักมีส่วนอินทรอนแทรกอยู่ด้วย การสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA โดยปฏิกิริยา reverse transcription ซึ่งมีเอนไซม์ reverse transcriptase เป็นตัวเร่ง cDNA ที่ลอกรหัสจาก mRNA ซึ่งเป็นผลผลิตของยีนบางยีนที่มีการแสดงออกในช่วงเวลาขณะนั้น และเป็นส่วนของยีนที่ไม่มีอินทรอน mRNA มีช่วงอายุสั้น จะถูกสลายไปได้อย่างรวดเร็วหากมีการปนเปื้อนของเอนไซม์ RNase ปริมาณ mRNA ที่พบในเนื้อเยื้อจะมีน้อยมาก จึงทำให้ cDNA ที่สังเคราะห์ได้นั้นยังมีปริมาณน้อยลง หรืออาจได้ cDNA ไม่ครบตามชนิดของ mRNA ดังนั้นจึงมีการนำเทคนิค PCR มาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้มากขึ้น โดยการแยก mRNA จากเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตที่ทำการศึกษานั้นเพื่อใช้เป็น template ในการสังเคราะห์ cDNA สายแรก

ความบริสุทธิ์สะอาดของ mRNA เป็นสิ่งสำคัญเนื่องจากเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA หาก mRNA ที่ได้ไม่บริสุทธิ์ก็จะทำให้ได้ cDNA ที่ไม่บริสุทธิ์ด้วย น้ำที่ใช้ในงาน RNA ต้องเป็นน้ำ deionize โดยใส่ DEPC ลงในน้ำที่กลั่น 2 ครั้ง ส่วนเครื่องแก้วแช่ด้วย 0.5 M NaOH ล้างออกด้วยน้ำ deionize อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 160-180 °ซ เป็นเวลา 4-9 ชั่วโมง อุปกรณ์อื่นที่เป็นพลาสติก เช่นหลอดไมโครเซนตริฟิวส์และทิปใช้ครั้งเดียวทิ้ง ใส่ถุงมือทุกครั้งเพื่อป้องกันการปนเปื้อนและสลายตัวของ RNA

5.1 การสกัด RNA

การสกัด RNA ทั้งหมดจากใบหม่อนน้อย (*M. rotundiloba*) โดยใช้ TRIzol reagent เก็บใบหม่อนที่เลี้ยงบนอาหารที่เดิมเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 300 และ 500 มิลลิโมลาร์ในเวลาต่างๆ ตัวอย่างละ 100 mg นำมาบดให้ละเอียดในโกร่งโดยใช้ไนโตรเจนเหลวช่วยในการบดจนเป็นผงละเอียด เติม TRIzol reagent ลงไป 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เพื่อให้สารนิวคลีโอโปรตีนแยกตัวออกมา จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม 0.2 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมืออย่างแรง ประมาณ 15 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 15-30 °ซ นาน 2-3 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 g นาน 15 นาทีที่ 4 °ซ สารผสมจะแยกเป็น 2 ชั้น ชั้นบนสุดเป็นชั้นน้ำที่มี RNA อยู่ ในขณะที่ชั้นล่างเป็นชั้นที่มีสีแดงเป็นชั้นของฟีนอล-คลอโรฟอร์ม นำของเหลวชั้นบนที่มี RNA ใส่ในหลอดใหม่เติมไอโซโพรพานอล 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ -20 °ซ นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้ RNA ทั้งหมด

ตกตะกอน จากนั้นแยกตะกอนโดยนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ล้างตะกอน RNA 2 ครั้งด้วย 75% (ปริมาตรต่อปริมาตร) เอทานอลและหมุนเหวี่ยงที่ 7,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นำ RNA ที่ล้างแล้ววางทิ้งให้เอทานอลระเหยจนหมดจึงนำไปละลายในน้ำที่ปราศจากไอออนและบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิ 55-60 °ซ นาน 10 นาทีเพื่อให้ RNA ละลาย จากนั้นจึงตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของ RNA ที่สกัดได้จากใบและรากหม่อนน้อยและไปสังเคราะห์เป็น cDNA ทันที

5.2 การตรวจสอบคุณภาพของ RNA ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส

เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสเป็นเทคนิคที่ใช้แยกและทำให้ DNA หรือ RNA บริสุทธิ์ขึ้น โดยใช้ 1% อะกาโรสผสมกับ MOPS buffer (ดูภาคผนวก) แล้วให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟจนอะกาโรสละลายหมดจึงเทลงในถาดเจล รอนอะกาโรสแข็งตัวจึงนำไปใส่ในเครื่องอิเล็กโทรโฟริซิสที่มี MOPS buffer อยู่ จากนั้นจึงผสม RNA กับ 6X gel-loading buffer และใส่ลงในช่องหัวเข้าๆ จนครบ เปิดเครื่องโดยใช้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ 30 นาที และย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์

5.3 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของ RNA ด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี

วัดความเข้มข้นของ RNA ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่มีค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร โดย 1 หน่วยของค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรเท่ากับ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Sambrook and Russel, 2001) ค่าความเข้มข้นของ RNA ในแต่ละตัวอย่างคำนวณให้อยู่ในรูปไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้สมการ

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times \text{dilution factor} \times 40 \mu\text{g/ml}$$

เมื่อ [RNA] คือความเข้มข้นของ RNA

ตรวจวัดคุณภาพความบริสุทธิ์ของ RNA ที่สกัดได้จากอัตราส่วนระหว่างค่า A_{260}/A_{280} ถ้าอัตราส่วนอยู่ระหว่าง 1.8 และ 2.0 แสดงว่าได้ RNA ที่มีคุณภาพดี

5.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค RT-PCR

การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนสามารถทำได้ 2 ระดับคือ ระดับ transcriptional และ ระดับ translation การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับ transcriptional สามารถทำได้โดยใช้เทคนิค Northern blot, RNase protection assay, hybridization หรือ RT-PCR

เทคนิค RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) เป็นเทคนิคที่มีความไวสูงมากในการตรวจสอบ mRNA ในปัจจุบันเราสามารถใช้นี้ในการตรวจและวัดปริมาณระดับของ mRNA หรือความแตกต่างของการแสดงออกของยีนได้จากสารตัวอย่างเพียงเล็กน้อยในระดับ 0.01-0.1 พิโคกรัมเท่านั้น ในขณะที่เทคนิค Northern blot และ RNase protection assay สามารถตรวจสอบวัดได้เมื่อมีปริมาณของ RNA 1-10 และ 0.1-1 พิโคกรัมตามลำดับ (Sagerstrom and Sive, 1996) หลักการของเทคนิคนี้คือเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA ก่อนโดยใช้ oligo(dT) primers และเอนไซม์ reverse transcriptase ซึ่งเรียกว่า reverse transcription เอนไซม์ reverse transcriptase ที่นิยมใช้มีอยู่ 2 ชนิดคือ Avian myeloblastosis virus (AMV) และ Moloney murine leukemia virus (MoMuLV) reverse transcriptases ได้เป็น first-stranded cDNA จากนั้นจึงเพิ่มปริมาณ โดยใช้ specific primer และ Taq DNA polymerase

การสังเคราะห์ cDNA สายแรกโดยถอดรหัสจาก total RNA ที่สกัดได้จากใบและราก หม่อนน้อยใช้สำเร็จรูป Reverse transcription system kit (Promega) ที่มี oligo(dT) 15 primer และ AMV Reverse transcriptase เป็นตัวถอดรหัส ในปฏิกิริยา 20 มิลลิลิตร ประกอบด้วย RNA ทั้งหมด 1 ไมโครกรัม, เอนไซม์ AMV Reverse transcriptase 15 หน่วย, oligo(dT)15 primer 0.5 มิลลิกรัม, $MgCl_2$ 5 มิลลิโมลาร์, 1x Reverse transcription buffer, dNTP 1 มิลลิโมลาร์และ Recombinant RNasin® ribonuclease inhibitor 1 หน่วยต่อไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 42 °C นาน 1 ชั่วโมงจึงนำให้ความร้อนที่ 95 °C นาน 5 นาที เพื่อแยกสายผสมระหว่าง RNA กับ cDNA และหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ AMV Reverse transcriptase จากนั้นบ่มตัวอย่างในน้ำแข็ง 5 นาที เจือจางสารละลาย cDNA สายแรกให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง (double distilled water) เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการทำ PCR หรือเก็บที่ -20 °C จนกว่าจะใช้งาน

5.5 ไพรมเมอร์สำหรับ PCR amplification of cDNA fragments จากใบหม่อน

5.5.1 การออกแบบไพรมเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนเลคตินในใบหม่อน

ออกแบบไพรมเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนเลคติน (MLL) จาก cDNA ของยีนเลคตินในใบหม่อน (Kankamol, 2003) โดยเปรียบเทียบกับยีนเลคตินในพืชชนิดอื่นที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกันเพื่อหาบริเวณอนุรักษ์ของยีนเลคติน มีลำดับเบสและขนาดดังในตารางที่ 2

5.5.2 การออกแบบไพรมเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 26S rRNA

การออกแบบไพรมเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 26S rRNA ของ *Morus sp.* ใช้หลักการเดียวกับการออกแบบไพรมเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนเลคติน เนื่องจากยีน 26S rRNA เป็นยีนที่ไม่มี การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกหรือเรียกอีกอย่างว่า housekeeping genes จึงนำมาใช้เป็น เครื่องหมายสำหรับตรวจวัดปริมาณของ cDNA ในแต่ละตัวอย่าง โดยออกแบบจากยีน 26S rRNA ของ *M. nigra* (AF479232) ซึ่งเป็น partial sequence มีลำดับเบสและขนาดดังในตารางที่ 2

5.5.2 การออกแบบไพรมเมอร์สำหรับตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับความเค็ม

โดยออกแบบไพรมเมอร์จากยีนที่เกี่ยวข้องกับความเค็มโดยใช้ degenerate primer เพื่อนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีนซึ่งแบ่งเป็นกลุ่มดังนี้ กลุ่มที่ 1 คือยีนที่เกี่ยวข้องกับ เอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์น้ำตาล (soluble sugar) ได้แก่ fructose 1,6-bisphosphatase gene (FBP), invertase gene (Inv) และ D-mannitol dehydrogenase gene (ManD) กลุ่มที่ 2 ได้แก่ยีนที่ผลิต โปรตีนในการตอบสนองต่อความเครียด ได้แก่ putative late-embryogenesis-abundant (LEA) gene กลุ่มที่ 3 คือยีนที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของโพรลีน ได้แก่ pyrroline-5-carboxylase synthetase gene (P5CS) มีขนาด และ pyrroline-5-carboxylase reductase gene (P5CR) และกลุ่มที่ 4 ได้แก่ยีนที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของโคไลน์ ได้แก่ betain aldehyde dehydrogenase gene (BADH) โดย ไพรมเมอร์แต่ละคู่มีลำดับเบสและขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ดังในตารางที่ 2

5.6 PCR amplification of cDNA fragments

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ใช้ cDNA สายแรกที่สังเคราะห์จากใบหม่อน เป็นสายต้นแบบ และใช้ไพรเมอร์ ดังในตารางที่ 5 ในปฏิกิริยา 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย cDNA สายแรก 10 ไมโครกรัม, dNTPs 10 มิลลิโมลาร์, $MgCl_2$ 50 มิลลิโมลาร์, 1x ImmoBuffer, primer 10 พิโคโมล และ 1 หน่วย Immolase DNA polymerase ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ครบ 10 มิลลิลิตร และผสมเบา ๆ ให้เข้ากัน ใช้สภาวะดังนี้ บ่มที่ 95 °ซ นาน 7 นาทีเพื่อกระตุ้นให้เอนไซม์ทำงาน จากนั้น ทำ denaturing ที่ 94 °ซ นาน 30 วินาที, annealing 50 °ซ นาน 30 วินาที (สำหรับยีนเลคตินใช้ อุณหภูมิ 56 °ซ) และ 72 °ซ นาน 30 วินาที จำนวน 30 รอบ และสุดท้าย extension ที่ 72 °ซ นาน 4 นาที 1 รอบ ตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนเลคตินในใบหม่อนด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ใน 1.5 % อะกาโรสเจล เปรียบเทียบกับ 100 bp + 1.5 kb DNA plus ladder

ตารางที่ 5 คู่ไพรเมอร์และลำดับเบสที่ใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่างๆ

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส	ขนาด (bp)	Tm (°C)
M26SF (forward primer)	5'>GACTCAGAACTGGTACGG<3'	250	50
M26SR (reverse primer)	5'>ATAGTAGACAGGGACAGTGG<3'		
MLLF (forward primer)	5'> GACGGTTCATACACCGGAAT <3'	356	56
MLLR (reverse primer)	5'> GTCCAACCAATAGCCGACAC <3'		
FBPF(forward primer)	5'>CAACATYGACTGTGGYGT<3'	375	50
FBPR (reverse primer)	5'> ACCATACTTYCRATGATACT<3'		
InvF (forward primer)	5'>CAAGCATGYCCTCAAAATG<3'	710	50
InvR (reverse primer)	5'>ATTCAAAGAAGCCTCCATA<3'		
ManDF (forward primer)	5'>GCTCCTYTVYTBGTGTC<3'	462	50
ManDR (reverse primer)	5'>AAAATCAAKCATYTCTTGTG>3'		
LEAF (forward primer)	5'>SAAGRRMYDYRYSKMGGAGA<3'	415	50
LEAR (reverse primer)	5'>SVABGYDBKHWBCWYVDDCT<3'		
P5CSF (forward primer)	5'>AAGGCDTGTGHCSTGTTGG<3'	1,370	50
P5CSR (reverse primer)	5'>TCVGCATGYCCRAGWACAGG<3'		
P5CRF (forward primer)	5'>ATGGWGGRGTDGCWGCWGG<3'	214	50
P5CRR (reverse primer)	5'>GCRGMAACAACDGCA YTHATC<3'		
BADHF (forward primer)	5'>ARCTTGDDGGDAAAAGYCC<3'	715	50
BADHR (reverse primer)	5'>TACCABCCCCATGGTTC<3'		

ผลและวิจารณ์

ผล

1. การพัฒนาสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหม่อน

1.1 การเตรียมต้นหม่อนสำหรับการทดลอง

การเพาะเลี้ยงหม่อนน้อยได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ศึกษา กิจกรรมของเอนไซม์ น้ำตาลและการแสดงออกระดับ RNA เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีเกลือโซเดียม คลอไรด์โดยใช้อาหารแข็งสูตร MS ที่มีฮอร์โมน BAP เพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 120 มิลลิลิตร ขวดละ 2 ต้น เมื่อได้รับฮอร์โมน BAP หม่อนจะมีการแบ่งเซลล์ และแตกยอดมากขึ้น จากนั้นจึงตัดยอดหม่อนแล้วย้ายมาเลี้ยงในอาหารวันสูตร MS ที่ไม่มีฮอร์โมน BAP โดยใช้วันความ เข้มข้น 0.8 % น้ำตาลซูโครส 3 % เมื่อหม่อนมีอายุ 2 สัปดาห์จะสูงประมาณ 2 เซนติเมตร มีใบ 3-5 ใบและเริ่มมีรากเล็กน้อยจึงนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

1.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของหม่อน

1.2.1 การหาความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของหม่อนโดย เปรียบเทียบการเจริญเติบโตเมื่อน้ำตาลซูโครสกับน้ำตาลทรายในท้องตลาด

หาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในอาหารให้เหมาะต่อการเจริญเติบโตของ หม่อน โดยใช้อาหารสูตร MS ที่มีฮอร์โมน BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีวัน 0.8 % และมีความเข้มข้น ของน้ำตาลต่างกันไปตามลำดับคือ 1, 2 และ 3 % จากการวัดการเจริญเติบโตจากความสูง จำนวนใบ และจำนวนยอดทุก 3 วัน ดังภาพที่ 9-11 พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 2 และ 3 % หม่อนมีการ เจริญเติบโตใกล้เคียงกัน เมื่ออายุ 1 เดือนพบว่าหม่อนมีความสูงประมาณ 2.5 เซนติเมตร มีใบ ประมาณ 30 ใบและมียอดประมาณ 6 ยอด เมื่อเปรียบเทียบน้ำตาลที่ใช้ทั้ง 2 ชนิดคือน้ำตาลซูโครส และน้ำตาลทรายในท้องตลาดพบว่าการเจริญเติบโตของหม่อนใกล้เคียงกันทั้งความสูง จำนวนใบ และจำนวนยอด ดังนั้นจึงเลือกใช้น้ำตาลทรายในท้องตลาดที่มีความเข้มข้น 3 % ใช้ในการทดลอง ต่อไป

1.2.2 การหาความเข้มข้นของฮอร์โมน BAP ที่เหมาะสมสำหรับการ เจริญเติบโตของหม่อน

ตัดยอดหม่อนมาเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 3 % มีวุ้น 0.8 % แต่มีความเข้มข้นของ BAP ต่างกันตามลำดับคือ 0, 0.1, 0.25, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยคัดเลือกยอดที่มีขนาด จำนวนใบและความยาวเท่ากันปลูกบนอาหารที่เตรียมไว้ 5 ขวดขวดละ 2 ต้น วัดการเจริญเติบโตจากความสูง จำนวนใบและจำนวนยอดทุก 3 วัน ดังภาพที่ 12-14 พบว่าปริมาณฮอร์โมน BAP ที่ทำให้หม่อนแตกยอดได้มากที่สุด 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งความสูงของหม่อนจะต่ำที่สุด ในขณะที่ต้นที่ไม่ได้รับฮอร์โมน BAP จะไม่มีการแตกยอดเลย แต่จะเพิ่มความสูงแทน การเจริญเติบโตของหม่อนจะเริ่มคงที่ตั้งแต่วันที่ 20 และจึงนำยอดหม่อนไปเพาะเลี้ยงเพื่อทำการทดลองต่อไปได้

โดยสรุปอาหารวุ้นสูตร MS ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหม่อน ประกอบด้วยวุ้น 0.8 % น้ำตาลซูโครส 3 % BAP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมง ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) อุณหภูมิ 25 °ซ ความชื้น 70-80 % นาน 20 วัน สามารถนำยอดหม่อนไปเพาะเลี้ยงเพื่อทำการทดลองการตอบสนองต่อความเครียด การหาความเข้มข้นของวุ้นที่เหมาะสมนั้น ได้ทำการทดลองเตรียมอาหารวุ้นที่มีปริมาณวุ้น 0.8, 1 และ 1.5 % พบว่าปริมาณวุ้น 0.8 % อาหารมีลักษณะที่เหมาะสมไม่อ่อนหรือแข็งจนเกินไป ส่วนปริมาณวุ้น 1 และ 1.5 % นั้นอาหารแข็งเกินไปและอาจมีผลต่อการเจริญเติบโตของหม่อนได้ ดังนั้นจึงเลือกใช้วุ้น 0.8 % ในการทดลองต่อไป

2. การตอบสนองความเครียดจากเกลือของหม่อน

2.1 การเตรียมต้นหม่อนสำหรับปลูกในสภาพที่มีเกลือความเข้มข้นต่างๆ กัน

เมื่อต้นหม่อนที่เลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 3 % วุ้น 0.8 % และ BAP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอายุ 20 วันย้ายมาปลูกในขวดใหญ่ขนาด 240 มิลลิลิตร ที่มีเวอร์มิคูไลต์ ปลอดเชื้อเป็นวัสดุจำวนหนัก 10 กรัม ผสมอยู่ขวดละ 2 ต้นใช้เวลาประมาณ 2 สัปดาห์ต้นหม่อนสูงประมาณ 2-3 เซนติเมตร มีรากและใบประมาณ 3-5 ใบ คัดเลือกต้นที่มีขนาดความสูงและจำนวนใบเท่า ๆ กัน ย้ายมาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมแต่ไม่เติมน้ำตาลก่อน 1 สัปดาห์ เพื่อให้ต้นหม่อนปรับสภาพให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมก่อนทำการทดลองในอาหารที่มีเกลือ (ไม่เติมน้ำตาล) พบว่าเมื่อเลี้ยงหม่อนในอาหารเหลวผสมกับวัสดุจำวน ต้นหม่อนจะมีการเจริญเติบโตและมีรากเพิ่มขึ้นมากกว่าต้นหม่อนที่เลี้ยงในอาหารวุ้น เนื่องจากวัสดุจำวนจะมีความโปร่งคล้ายดินมากกว่าอาหารวุ้น จึงทำให้รากหม่อนสามารถชอนไชได้ดีกว่า

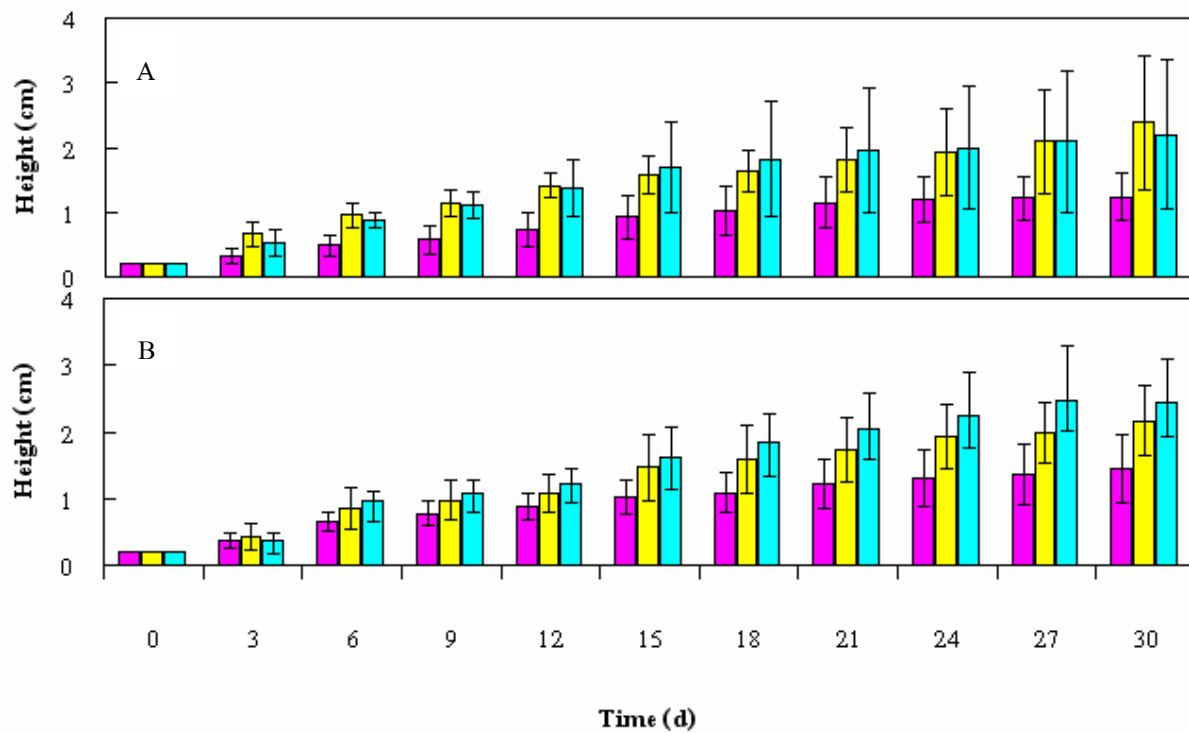
2.2 การหาระยะเวลาและลักษณะทางกายภาพของหม่อนเมื่อได้รับความเครียดจากเกลือ

ศึกษาลักษณะทางกายภาพของหม่อนในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นต่างๆ ก่อนจะทำการทดลอง พบว่าหม่อนสามารถทนอยู่ในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้น 600 มิลลิโมลาร์ได้ประมาณ 7 วัน โดยหม่อนจะเริ่มแสดงอาการเหี่ยวในช่วงเวลาที่ 12 ของขวดที่มีความเข้มข้นเกลือ 600 มิลลิโมลาร์และจะมีอาการเหี่ยวลงเรื่อยๆ ใบเริ่มซีดและมีจุดสีขาวแบบขำน้ำในวันที่ 3 และกระจายไปทั่วใบในวันที่ 7 ส่วนขวดที่มีความเข้มข้นเกลือ 300 และ 500 มิลลิโมลาร์จะเริ่มสังเกตเห็นอาการเหี่ยวเมื่อผ่านไป 1 วัน และใบเริ่มมีสีขาวซีดในวันที่ 5 ส่วนต้นที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์เริ่มเห็นอาการเหี่ยวเล็กน้อยในวันที่ 7

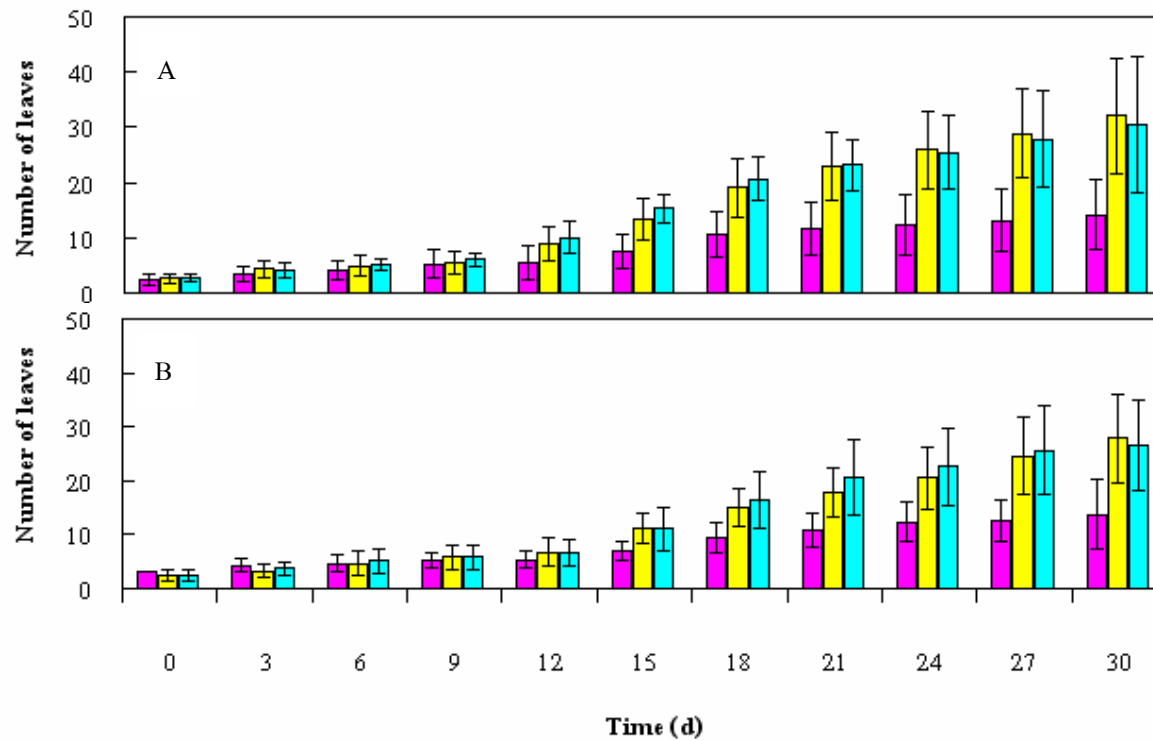
2.3 การเตรียมตัวอย่างหม่อนเพื่อศึกษากลไกการตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือ

หลังจากปรับสภาพแวดล้อมต้นหม่อนครบ 1 สัปดาห์จึงย้ายมาปลูกในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้น 0, 100, 300, 500 และ 600 มิลลิโมลาร์ ทั้งหมด 5 ชุดความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 27 ขวด ขวดละ 2 ต้น โดยเก็บตัวอย่างใบและรากหม่อนในแต่ละชุดความเข้มข้นชุดละ 3 ขวดต่อ 1 เวลา เมื่อเวลาผ่านไป 0, 1, 3, 6, 12, 24, 72, 120 และ 168 ชั่วโมง รวม 9 ครั้ง และเก็บเพิ่มที่เวลา 0.5

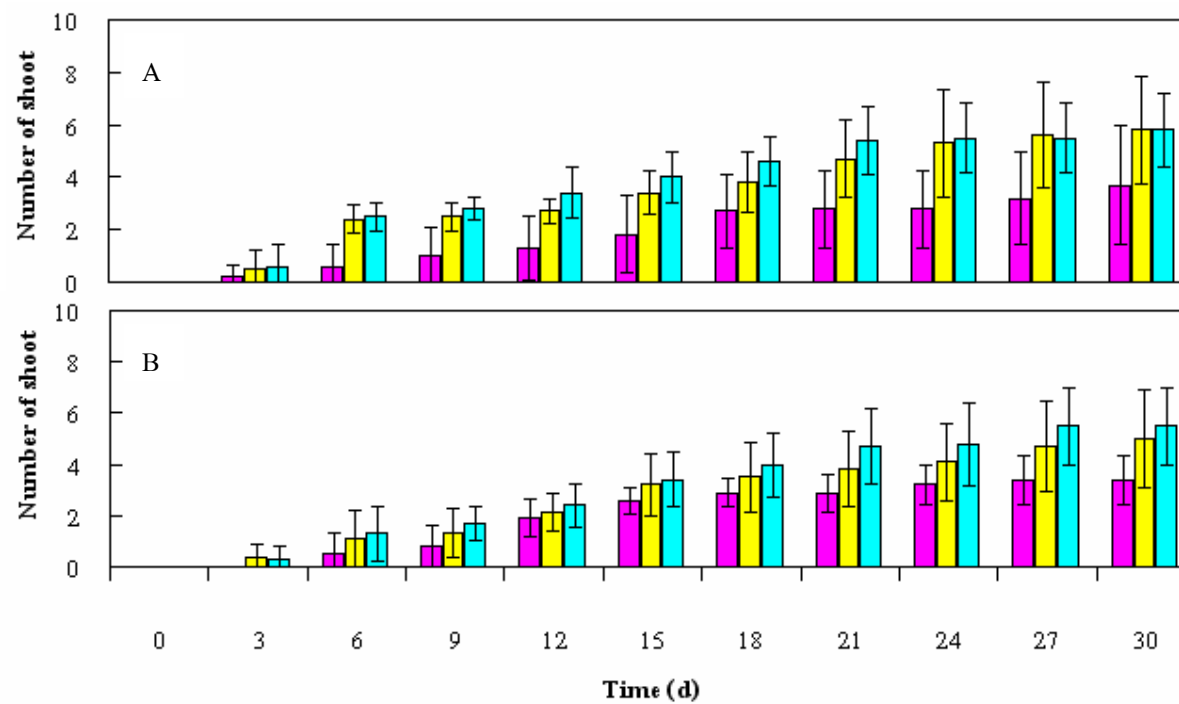
ชั่วโมงสำหรับการสกัด RNA นำตัวอย่างใบและรากหม่อนสำหรับสกัดเอนไซม์และ RNA ล้างน้ำกลั่นให้สะอาดและซับให้แห้งใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แช่ในโตรเจนเหลวและเก็บที่ -70°C ทันที โดยตัวอย่างที่นำไปสกัด RNA ให้เติม 2 % SDS ลงไปก่อนที่จะแช่ในโตรเจนเหลว ในช่วงวันแรกที่เก็บตัวอย่างพบว่าต้นหม่อนที่อยู่ในสภาวะที่มีเกลื้อ ต้นหม่อนจะอ่อนและเหี่ยวเล็กน้อย เนื่องจากขาดน้ำและยังปรับตัวกับความเค็มไม่ได้ แต่หลังจากนั้นจนถึงวันที่ 7 ต้นหม่อนจะเริ่มแข็งแรงขึ้นแต่ยังมีการเหี่ยวตามความเข้มข้นของเกลื้อยิ่งสูงก็จะยิ่งเหี่ยวมาก ดังภาพที่ 15



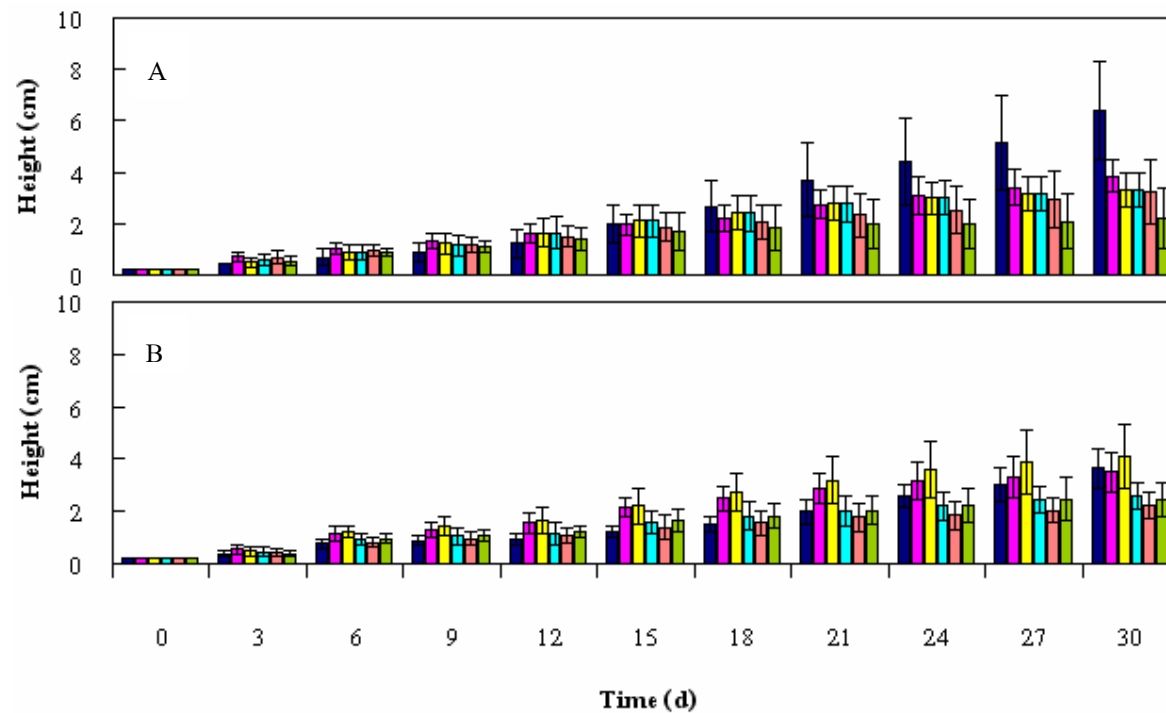
ภาพที่ 9 ผลของปริมาณน้ำตาลซูโครส (A) และน้ำตาลยี่ห้อมิตรผล (B) ต่อความสูงของต้นหอมในเวลา 1 เดือน เมื่อน้ำตาล 1 % (■), น้ำตาล 2 % (■) และ น้ำตาล 3 % (■)



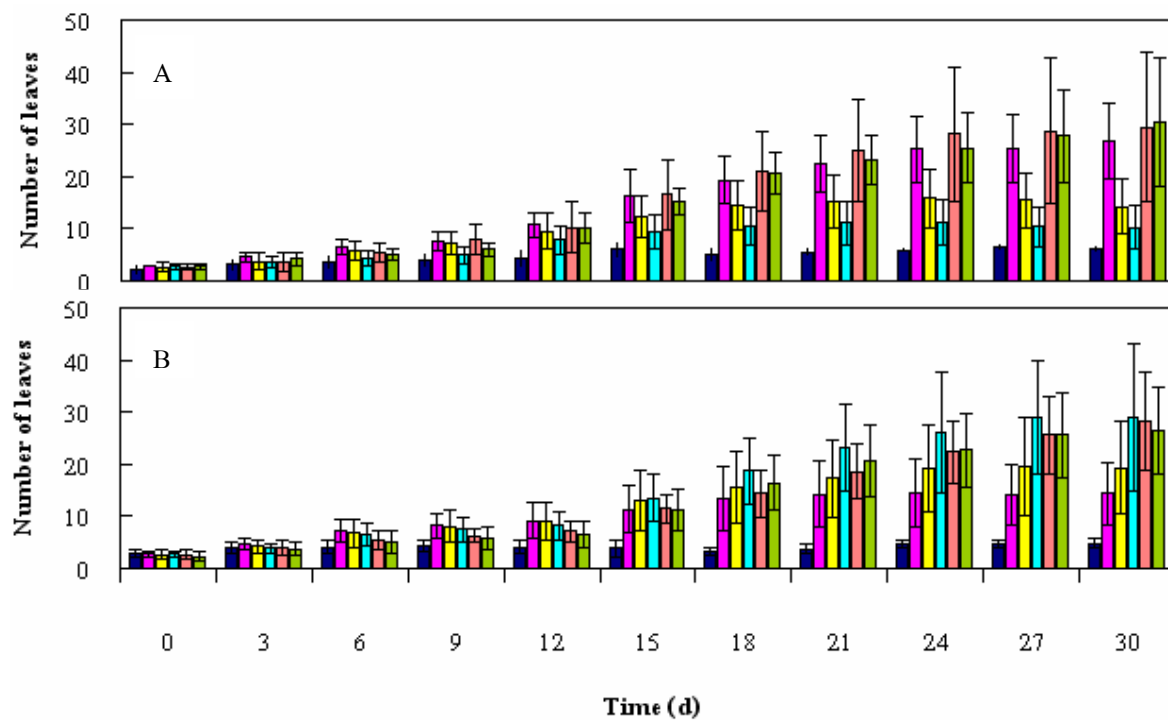
ภาพที่ 10 ผลของปริมาณน้ำตาลซูโครส (A) และน้ำตาลยี่ห้อมิตรผล (B) ต่อจำนวนใบของต้นหม่อนในเวลา 1 เดือน เมื่อน้ำตาล 1 % (■), น้ำตาล 2 % (■) และน้ำตาล 3 % (■)



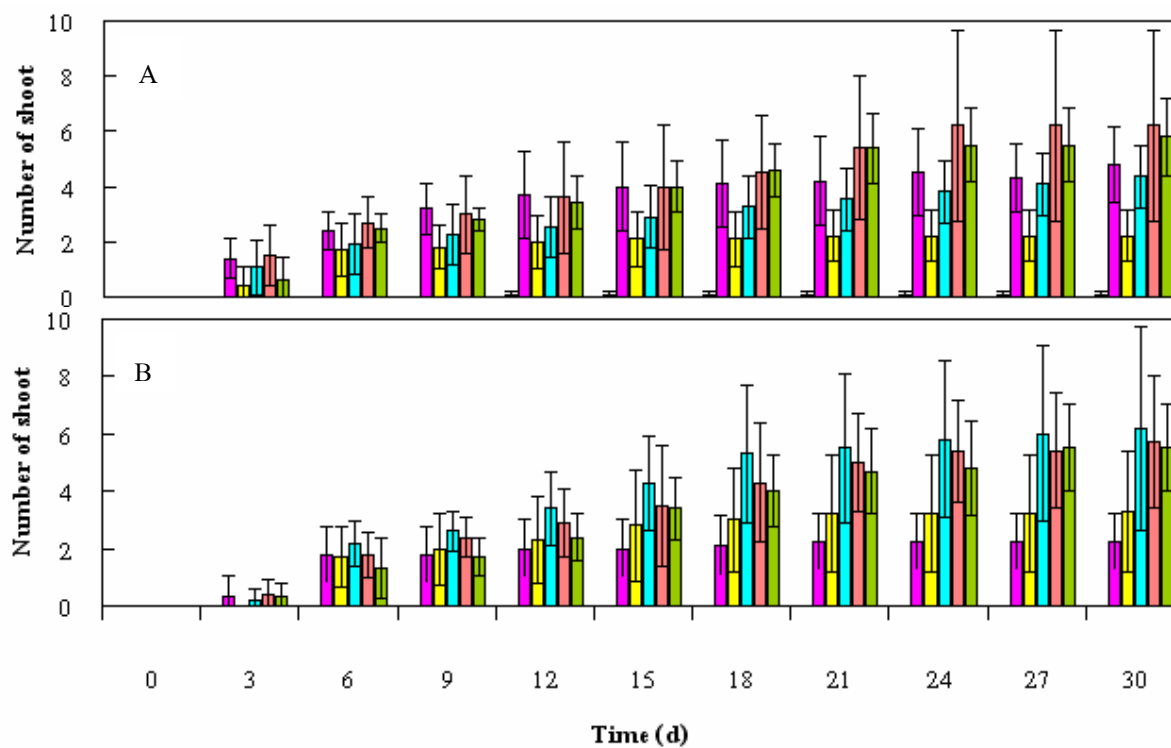
ภาพที่ 11 ผลของปริมาณน้ำตาสโครส (A) และน้ำตาสโครสที่มีฮอร์โมน (B) ต่อจำนวนยอดของต้นหม่อนในเวลา 1 เดือน เมื่อน้ำตาล 1 % (■), น้ำตาล 2 % (■) และน้ำตาล 3 % (■)



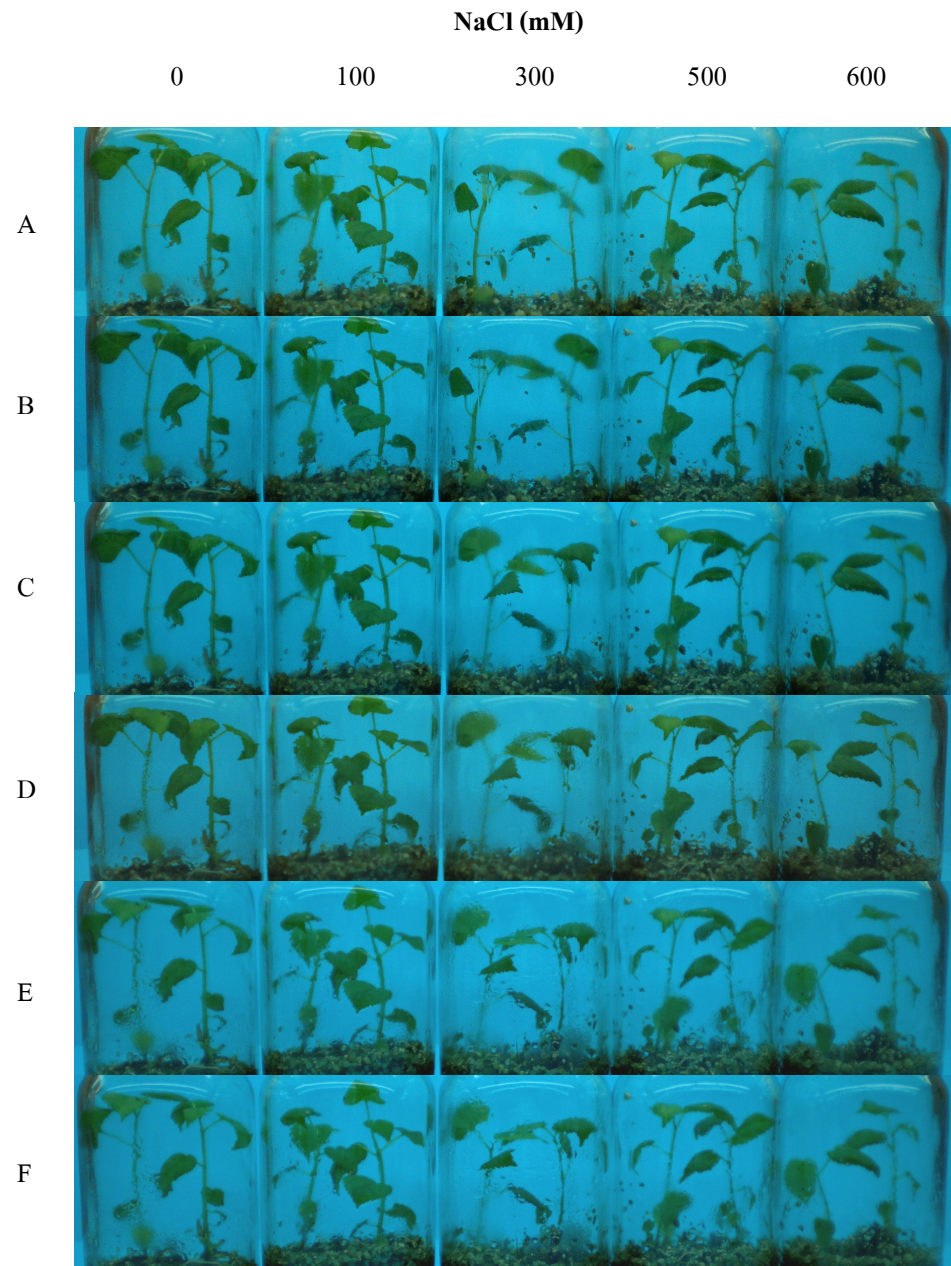
ภาพที่ 12 ผลของปริมาณ BAP ในอาหารที่ใช้ น้ำตาลซูโครส (A) และน้ำตาลทอกลาดยี่ห้อมิตรผล (B) ต่อความสูงของต้นหม่อนในเวลา 1 เดือน เมื่อ BAP 0 mg/l (■), BAP 0.1 mg/l (■), BAP 0.25 mg/l (■), BAP 0.5 mg/l (■), BAP 0.75 mg/l (■) และ BAP 1.0 mg/l (■)



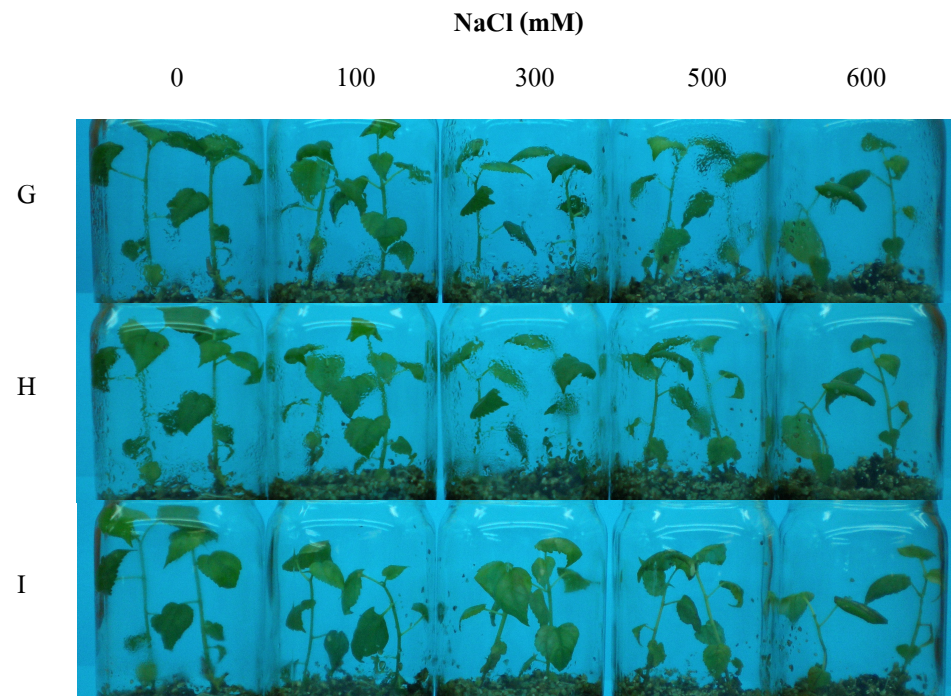
ภาพที่ 13 ผลของปริมาณ BAP ในอาหารที่ใช้ น้ำตาลซูโครส (A) และ น้ำตาลทอกลาคีห้อมมิตรผล (B) ต่อจำนวนใบของต้นหอมในเวลา 1 เดือน
เมื่อ BAP 0 mg/l (■), BAP 0.1 mg/l (■), BAP 0.25 mg/l (■), BAP 0.5 mg/l (■), BAP 0.75 mg/l (■) และ BAP 1.0 mg/l (■)



ภาพที่ 14 ผลของปริมาณ BAP ในอาหารที่ใช้ น้ำตาลซูโครส (A) และน้ำตาลทอ้งคลาดี้ห้อมิตรผล (B) ต่อจำนวนยอดของต้นหม่อนในเวลา 1 เดือน
เมื่อ BAP 0 mg/l (■), BAP 0.1 mg/l (■), BAP 0.25 mg/l (■), BAP 0.5 mg/l (■), BAP 0.75 mg/l (■) และ BAP 1.0 mg/l (■)



ภาพที่ 15 ลักษณะทางกายภาพของดินหม่อนหลังย้ายลงปลูกในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือ โซเดียมคลอไรด์ 0, 100, 300, 500 และ 600 mM ที่เวลาต่างๆ ดังนี้ 0 (A), 1 (B), 3 (C), 6 (D), 12 (E), 24 (F), 72 (G), 120 (H) และ 168 (I) ชั่วโมง



ภาพที่ 15 (ต่อ)

3. การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความเครียดของหม่อนในสถานะที่มีเกลือ

3.1 ATPase

จากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ATPase ที่สกัดจากใบและรากของหม่อนโดยวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ATPase ในเซลล์และ ATPase ในแวคิวโอลของหม่อนที่ได้รับความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 100, 300, 500 และ 600 มิลลิโมลาร์ ที่เวลาต่างๆ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ ATPase ทั้งหมดในเซลล์ที่บริเวณใบและรากหม่อนดังภาพที่ 16 ชุดควบคุมมีกิจกรรมของเอนไซม์ ATPase น้อยมาก และเมื่อได้รับความเครียดจากเกลือที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ กิจกรรมของเอนไซม์ยังคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงทั้งในใบและราก แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือเป็น 300 มิลลิโมลาร์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ในรากกลับเพิ่มสูงขึ้น ขณะที่ใบมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้นเพียงเล็กน้อยในช่วงวันแรก และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือเป็น 500 มิลลิโมลาร์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้งในใบและรากต่างเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน (3.5 และ 5.5 เท่าตามลำดับ) และมากที่สุดในการวันที่ 7 โดยในการยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าในใบ ส่วนที่ความเข้มข้นเกลือ 600 มิลลิโมลาร์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดต่ำอย่างชัดเจนโดยกิจกรรมของเอนไซม์ในใบลดลงต่ำกว่าชุดควบคุมเล็กน้อย ส่วนในการกิจกรรมของเอนไซม์ลดต่ำลงเช่นกันแต่ยังคงสูงกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ในชุดควบคุม

ส่วนเอนไซม์ ATPase ในแวคิวโอล ดังภาพที่ 17 มีกิจกรรมน้อยมากทั้งในใบและรากหม่อนเมื่อเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ ATPase ทั้งหมดในเซลล์ โดยในการชุดควบคุมมีกิจกรรมของเอนไซม์ ATPase ในแวคิวโอลน้อยกว่าในเซลล์ทั้งหมดประมาณ 2 เท่า โดยกิจกรรมของเอนไซม์ในการที่ได้รับความเข้มข้นเกลือ 500 มิลลิโมลาร์มีกิจกรรมสูงกว่ากิจกรรมในชุดควบคุม 3 เท่า ในขณะที่ความเข้มข้นเกลือ 300 และ 600 มิลลิโมลาร์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้น 2 เท่า ส่วนที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์กิจกรรมของเอนไซม์กลับลดลง 0.5 เท่า

3.2 Glucosidase

จากการทดลองวัดกิจกรรมของเอนไซม์ glucosidase ที่สกัดจากใบและรากของหม่อนเมื่อได้รับความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 100, 300, 500 และ 600 มิลลิโมลาร์ ที่เวลาต่างๆ พบว่าเอนไซม์ glucosidase ดังภาพที่ 18 ในการพบกิจกรรมของเอนไซม์น้อยมากและ

ไม่แตกต่างจากกิจกรรมในชุดควบคุมเลย ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ glucosidase ในใบเมื่อได้รับความเครียดจากเกลือความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ในช่วง 3 วันแรกกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับชุดควบคุม แต่หลังจากวันที่ 3 เป็นต้นไปกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มเพิ่มสูงขึ้นเล็กน้อย และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเกลือเป็น 300 มิลลิโมลาร์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจน (ประมาณ 2.5-4 เท่า) เมื่อเทียบกับชุดควบคุมและมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 1 ในขณะที่เพิ่มความเข้มข้นของเกลือเป็น 500 มิลลิโมลาร์ พบว่าในช่วง 12 ชั่วโมงแรกกิจกรรมของเอนไซม์ใกล้เคียงกับกิจกรรมของเอนไซม์ในใบเมื่อได้รับความเข้มข้นของเกลือ 300 มิลลิโมลาร์ แต่หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์กลับลดลงแต่ยังสูงกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ในชุดควบคุมประมาณ 3 เท่า ส่วนในใบที่ได้รับความเข้มข้นของเกลือ 600 มิลลิโมลาร์ พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงและน้อยกว่ากิจกรรมเอนไซม์ในชุดควบคุม

3.3 Glutathione-S-Transferase (GST)

จากการทดลองวัดกิจกรรมของเอนไซม์ GST ที่สกัดจากใบและรากของหม่อน เมื่อได้รับความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 100, 300, 500 และ 600 มิลลิโมลาร์ ที่เวลาต่างๆ พบว่าเอนไซม์ GST มีกิจกรรมเพิ่มสูงขึ้นทั้งในใบและรากดังภาพที่ 19 โดยในใบเมื่อได้รับความเครียดจากเกลือความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับชุดควบคุม แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือเป็น 300 มิลลิโมลาร์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้น 4 เท่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 7 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเกลือเป็น 500 มิลลิโมลาร์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มสูงกว่าในชุดควบคุมแต่ต่ำกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ในใบที่ได้รับความเข้มข้นของเกลือ 300 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ความเข้มข้น 600 มิลลิโมลาร์ กิจกรรมของเอนไซม์ต่ำกว่าชุดควบคุม

ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ GST ในรากเมื่อได้รับเกลือความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับชุดควบคุม แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเกลือเป็น 300 มิลลิโมลาร์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มสูงสุดในชั่วโมงที่ 3 และลดลงแต่ยังคงมีกิจกรรมสูงกว่าในชุดควบคุมมาก (3.7 เท่า) ในขณะที่เพิ่มความเข้มข้นเกลือเป็น 500 มิลลิโมลาร์ พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ (3.2 เท่า) ใกล้เคียงกับกิจกรรมของเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ ส่วนที่ความเข้มข้นเกลือ 600 มิลลิโมลาร์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่ำกว่าชุดควบคุมในช่วงวันแรก แต่หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 7

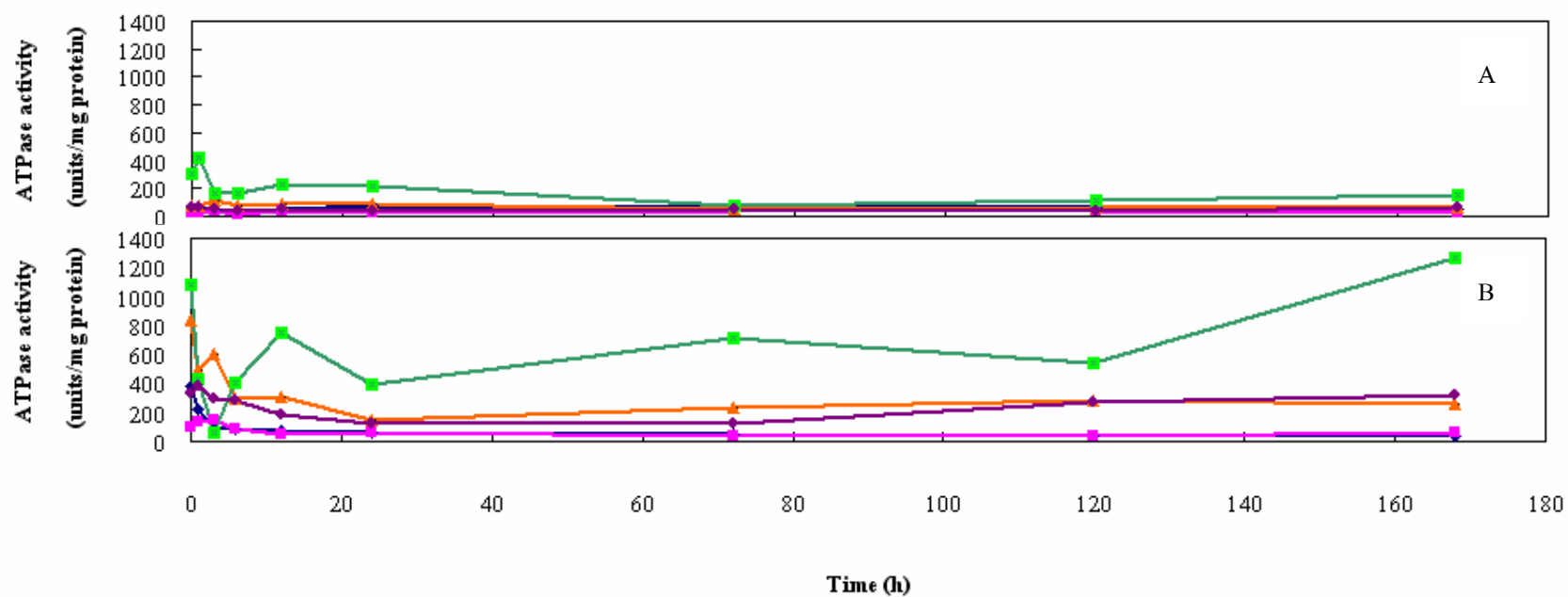
3.4 Peroxidase

จากการทดลองวัดกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ในสภาวะที่เป็นกรด (acidic peroxidase, pH 5) กลาง (neutral peroxidase, pH 7) และด่าง (basidic peroxidase, pH 10) ที่สกัดจากใบและรากของหม่อน เมื่อได้รับความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 100, 300, 500 และ 600 มิลลิโมลาร์ ที่เวลาต่างๆ โดยคาดว่าเอนไซม์ acidic peroxidase, neutral peroxidase และ basidic peroxidase จะเป็นเอนไซม์ที่อยู่บริเวณแควิวโอล, ไซโตพลาสซึม และเยื่อหุ้มเซลล์ ตามลำดับ จากการทดลองพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ acidic peroxidase ในใบดังภาพที่ 20 (A) เมื่อได้รับเกลือเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นมากกว่าในชุดควบคุม (1.4 เท่า) โดยจะเพิ่มขึ้นในช่วงหลังจากวันที่ 1 เป็นต้นไป เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเกลือเป็น 300 และ 500 มิลลิโมลาร์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นอีกและสูงกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ในต้นที่ได้รับ ความเข้มข้นเกลือ 100 มิลลิโมลาร์ 2.4 และ 1.7 เท่าตามลำดับ ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ที่ ความเข้มข้นเกลือ 600 มิลลิโมลาร์ ลดลงต่ำกว่าในชุดควบคุม ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ acidic peroxidase ในราก ภาพที่ 20 (B) เมื่อได้รับเกลือเข้มข้น 100 และ 600 มิลลิโมลาร์ มีกิจกรรมใกล้เคียงกับชุดควบคุม ในขณะที่เพิ่มความเข้มข้นเกลือเป็น 300 มิลลิโมลาร์ กิจกรรมของเอนไซม์ สูงกว่าในชุดควบคุม 3.4 เท่า ส่วนที่ความเข้มข้นเกลือ 500 มิลลิโมลาร์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ เพิ่มสูงขึ้น 3.5 เท่าโดยจะเพิ่มขึ้นในช่วงวันแรกแล้วจะค่อยๆ ลดลงจนเท่ากับชุดควบคุมในวันที่ 3 เป็นต้นไป

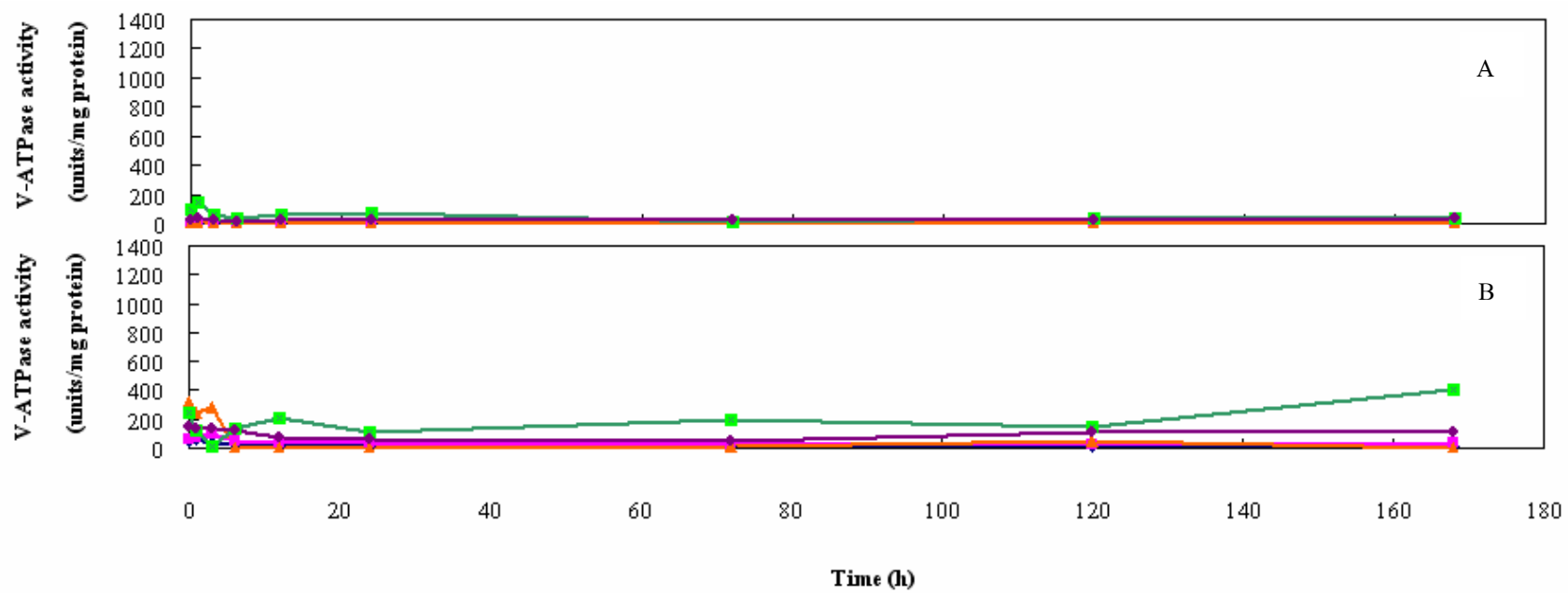
ในสภาวะที่เป็นกลางพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ neutral peroxidase ที่ใบมีกิจกรรมสูงที่สุดเมื่อเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ในสภาวะที่เป็นกรดและด่าง โดยกิจกรรมของเอนไซม์ neutral peroxidase ที่ใบภาพที่ 21 (A) เมื่อได้รับเกลือเข้มข้น 100 และ 600 มิลลิโมลาร์ มีกิจกรรมใกล้เคียงกับชุดควบคุม ในขณะที่เมื่อได้รับความเครียดจากเกลือเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ พบ กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้น 3.6 เท่า และสูงสุดในชั่วโมงที่ 3 แต่หลังจากนั้นกิจกรรมของ เอนไซม์จะค่อยๆ ลดลง ส่วนที่ความเข้มข้นเกลือ 500 มิลลิโมลาร์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่ม สูงขึ้นกว่าชุดควบคุม 3.5 เท่าโดยมีกิจกรรมสูงที่สุดในวันที่ 1 ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ neutral peroxidase ที่รากดังภาพที่ 21 (B) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์น้อยกว่าที่ใบ แต่ให้ผลการทดลองที่ คล้ายคลึงกันคือเมื่อได้รับเกลือเข้มข้น 100 และ 600 มิลลิโมลาร์ กิจกรรมของเอนไซม์ใกล้เคียงกับ ชุดควบคุม ในขณะที่เมื่อได้รับความเครียดจากเกลือเข้มข้น 300 และ 500 มิลลิโมลาร์ กิจกรรมของ เอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นกว่าชุดควบคุม ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ basidic peroxidase มีกิจกรรมน้อย

ที่สุดเมื่อเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ในสภาวะอื่น โดยเมื่อหม่อนได้รับความเครียดจากเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างจากชุดควบคุมเลยทั้งในใบและราก ดังภาพที่ 22

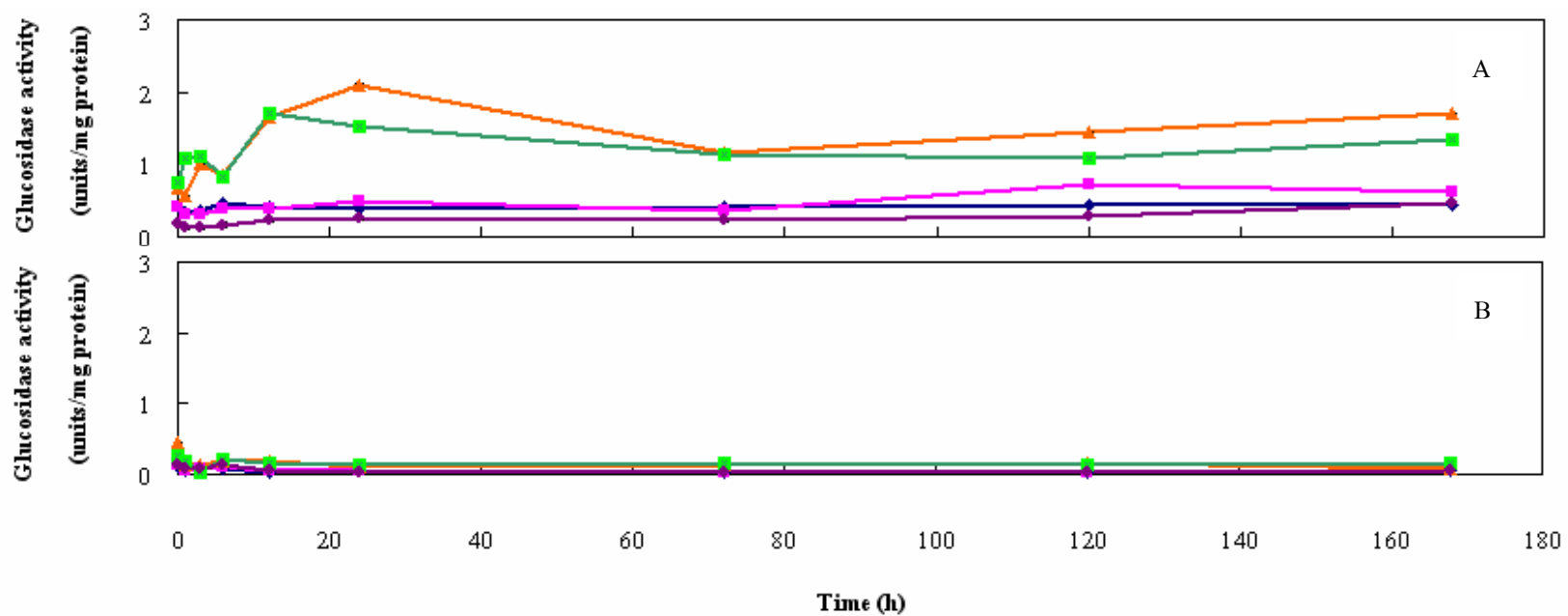
ผลการศึกษากลไกการตอบสนองต่อความเค็มของหม่อนน้อยโดยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ในใบและรากของหม่อนน้อยในสภาวะเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0, 100, 300, 500 และ 600 มิลลิโมลาร์) เป็นเวลา 7 วัน พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ ATPase, glucosidase, glutathione-S-transferase และ peroxidase ในใบและรากของหม่อนน้อยมีการตอบสนองต่อสภาวะความเข้มข้นของเกลือที่สูงขึ้น โดยในใบและรากหม่อนมีกิจกรรมของเอนไซม์ทุกชนิดสูงขึ้นที่ความเข้มข้นของเกลือ 300 และ 500 มิลลิโมลาร์ ขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ที่ความเข้มข้นของเกลือ 100 และ 600 มิลลิโมลาร์ ไม่ต่างจากชุดควบคุมเลย นอกจากนี้พบว่าในใบมีกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase และ glucosidase สูงกว่าในราก ในขณะที่พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ ATPase ในรากสูงกว่าในใบ และพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ GST ใกล้เคียงกันทั้งในใบและราก ดังนั้นจึงเลือกใช้เกลือที่ความเข้มข้น 300 และ 500 มิลลิโมลาร์ ในการศึกษาการแสดงออกของยีนต่างๆ ต่อไป จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าหม่อนน้อยใช้กลไก antioxidation, detoxification และ osmoprotection ในใบ และอาจใช้ ion pump ในรากเพื่อรักษาแรงดันออสโมติก



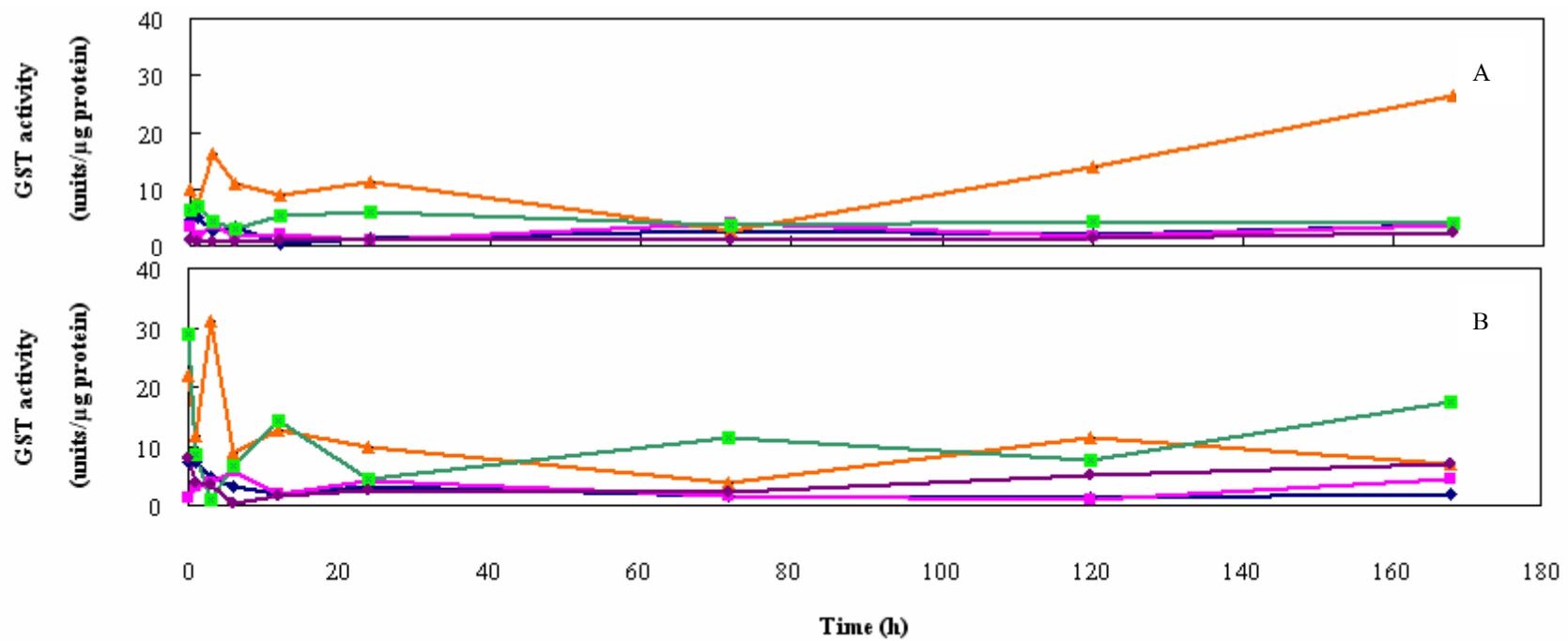
ภาพที่ 16 กิจกรรมของเอนไซม์ ATPase ทั้งหมดในเซลล์ที่ไป (A) และราก (B) หลังจากได้รับความเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 (—◆—), 100 (—■—), 300 (—▲—), 500 (—■—) และ 600 mM (—◆—) เป็นเวลา 7 วัน



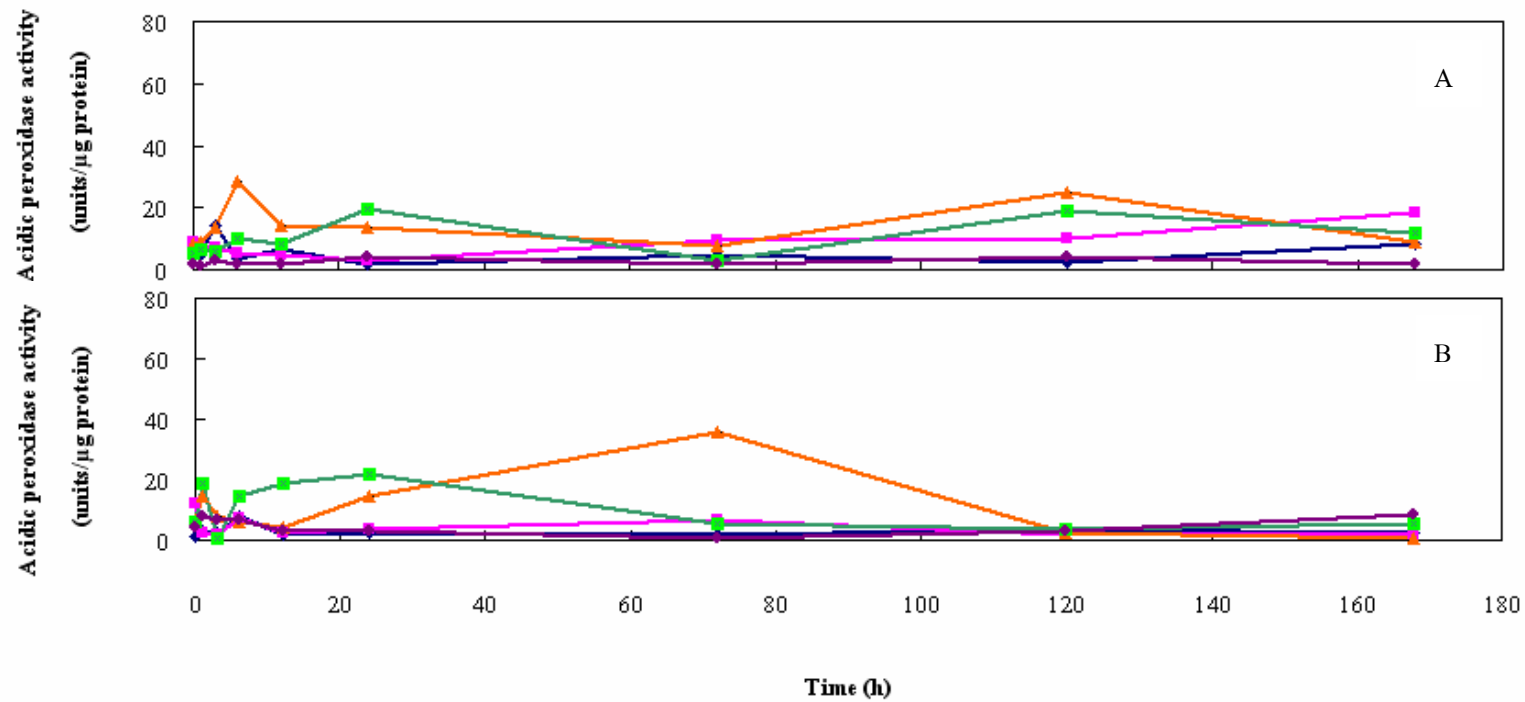
ภาพที่ 17 กิจกรรมของเอนไซม์ ATPase ในแวคิวโอลในใบ (A) และราก (B) หลังจากได้รับความเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0 (—◆—), 100 (—■—), 300 (—▲—), 500 (—■—) และ 600 mM (—◆—) เป็นเวลา 7 วัน



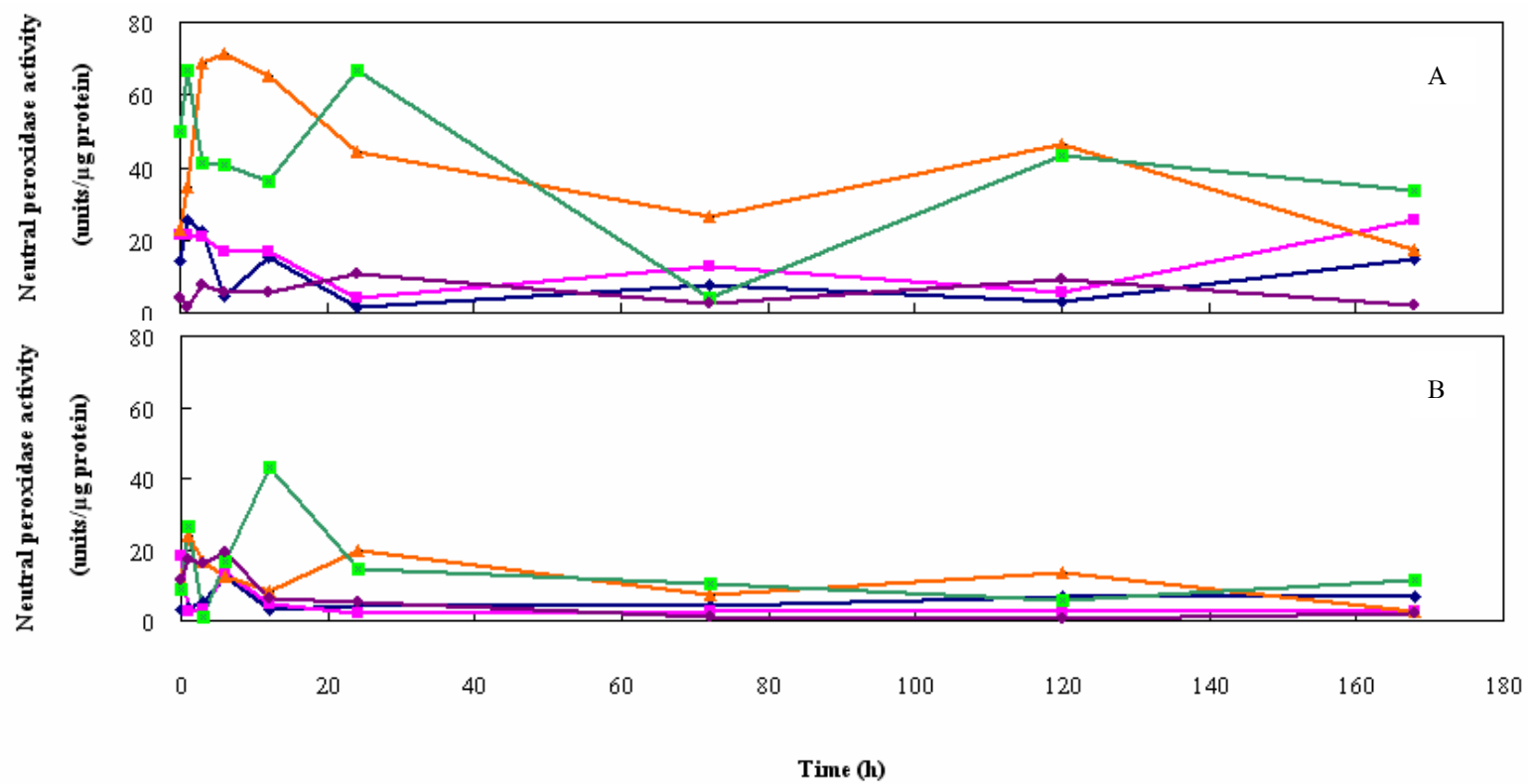
ภาพที่ 18 กิจกรรมของเอนไซม์ glucosidase ที่ใบ (A) และราก (B) หลังจากได้รับความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 (◆), 100 (■), 300 (▲), 500 (■) และ 600 mM (●) เป็นเวลา 7 วัน



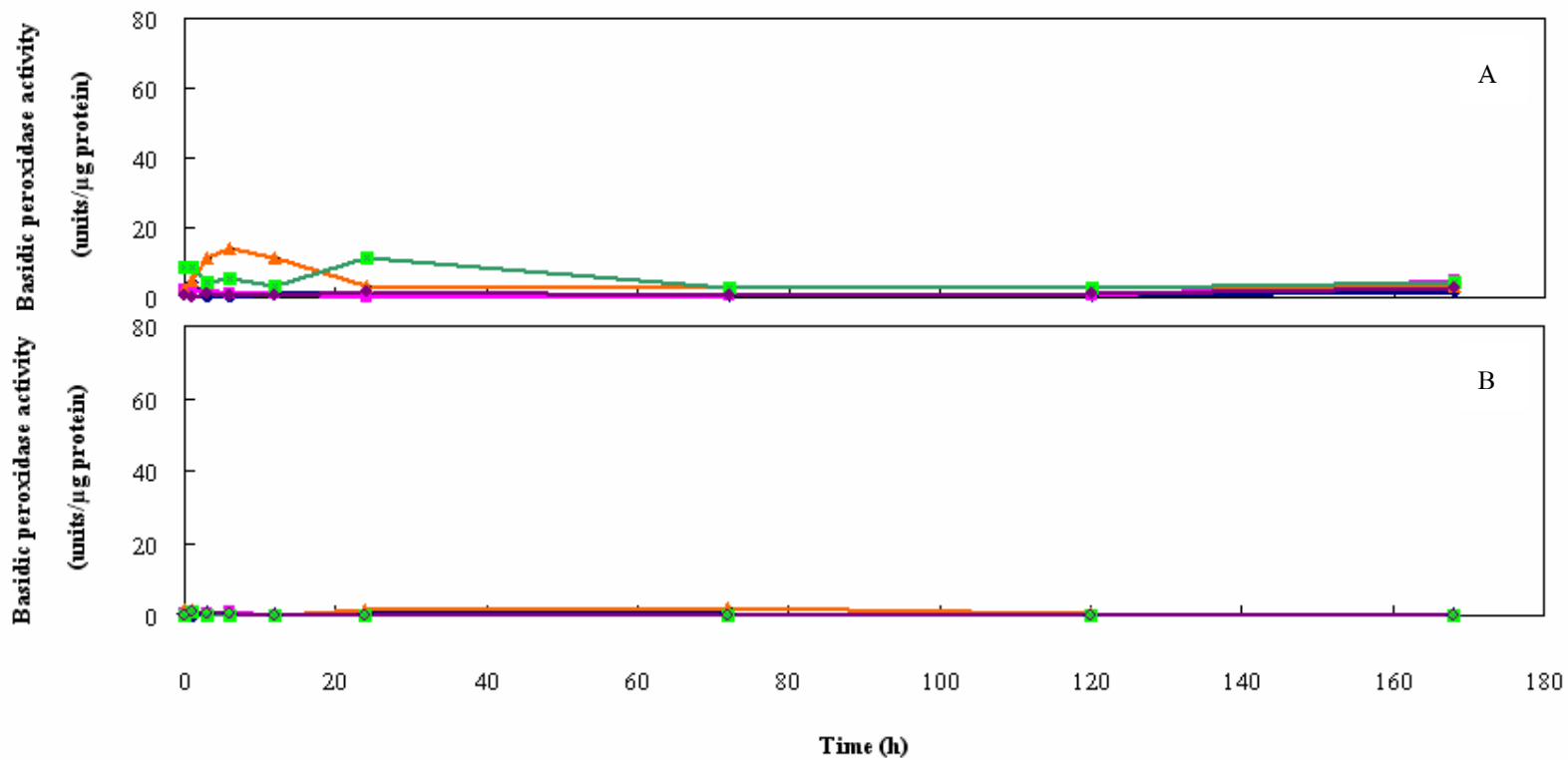
ภาพที่ 19 กิจกรรมของเอนไซม์ GST ที่ใบ (A) และราก (B) หลังจากได้รับความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 (●), 100 (■), 300 (▲), 500 (■) และ 600 mM (●) เป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 20 กิจกรรมของเอนไซม์ acidic peroxidase ที่ใบ (A) และราก (B) หลังจากได้รับความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 (—◆—), 100 (—■—), 300 (—▲—), 500 (—■—) และ 600 mM (—◆—) เป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 21 กิจกรรมของเอนไซม์ neutral peroxidase ที่ใบ (A) และราก (B) หลังจากได้รับความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 (—◆—), 100 (—■—), 300 (—▲—), 500 (—■—) และ 600 mM (—◆—) เป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 22 กิจกรรมของเอนไซม์ basic peroxidase ที่ใบ (A) และราก (B) หลังจากได้รับความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 (—◆—), 100 (—■—), 300 (—▲—), 500 (—■—) และ 600 mM (—●—) เป็นเวลา 7 วัน

ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยของความจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity) ในใบ

NaCl (mM)	ATPase	V-ATPase	Glucosidase	GST	Acidic peroxidase	Basidic peroxidase	Neutral peroxidase
	units/mg protein			units/ μ g protein			
0	57.54 $\pm$ 0.37	0.52 $\pm$ 3.48	0.41 $\pm$ 0.01	2.84 $\pm$ 13.34	5.95 $\pm$ 2.49	1.18 $\pm$ 1.76	12.17 $\pm$ 7.30
100	21.04 $\pm$ 0.21	0.00 $\pm$ 2.34	0.44 $\pm$ 0.02	2.55 $\pm$ 5.62	8.28 $\pm$ 1.51	1.53 $\pm$ 1.68	16.13 $\pm$ 5.17
300	76.99 $\pm$ 0.75	0.00 $\pm$ 8.78	1.23 $\pm$ 0.05	11.93 $\pm$ 17.91	14.36 $\pm$ 2.95	6.18 $\pm$ 3.19	44.10 $\pm$ 8.88
500	205.89 $\pm$ 1.40	64.85 $\pm$ 6.33	1.17 $\pm$ 0.04	4.85 $\pm$ 13.63	10.04 $\pm$ 2.09	5.62 $\pm$ 2.66	42.55 $\pm$ 13.57
600	50.43 $\pm$ 0.11	23.92 $\pm$ 1.36	0.22 $\pm$ 0.01	1.04 $\pm$ 3.69	2.38 $\pm$ 0.50	0.90 $\pm$ 0.86	5.35 $\pm$ 2.37

ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ยของความจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity) ในราก

NaCl (mM)	ATPase	V-ATPase	Glucosidase	GST	Acidic peroxidase	Basidic peroxidase	Neutral peroxidase
	units/mg protein			units/ μ g protein			
0	113.52 $\pm$ 2.90	53.81 $\pm$ 16.17	0.05 $\pm$ 0.01	3.54 $\pm$ 13.98	2.98 $\pm$ 0.72	0.33 $\pm$ 1.81	5.39 $\pm$ 5.80
100	77.28 $\pm$ 4.05	28.79 $\pm$ 0.74	0.06 $\pm$ 0.01	3.04 $\pm$ 4.35	4.37 $\pm$ 2.77	0.34 $\pm$ 1.21	5.87 $\pm$ 3.85
300	383.26 $\pm$ 8.49	99.70 $\pm$ 22.23	0.16 $\pm$ 0.01	13.15 $\pm$ 13.47	10.24 $\pm$ 13.91	0.74 $\pm$ 3.78	12.87 $\pm$ 14.49
500	622.10 $\pm$ 4.89	174.43 $\pm$ 6.70	0.16 $\pm$ 0.02	11.16 $\pm$ 11.09	10.51 $\pm$ 12.04	0.10 $\pm$ 3.11	15.38 $\pm$ 20.40
600	256.75 $\pm$ 1.48	105.25 $\pm$ 4.12	0.06 $\pm$ 0.01	3.78 $\pm$ 37.9	4.68 $\pm$ 3.86	0.19 $\pm$ 1.41	8.79 $\pm$ 6.36

4. การวิเคราะห์น้ำตาลในหม่อนด้วยเทคนิค HPLC

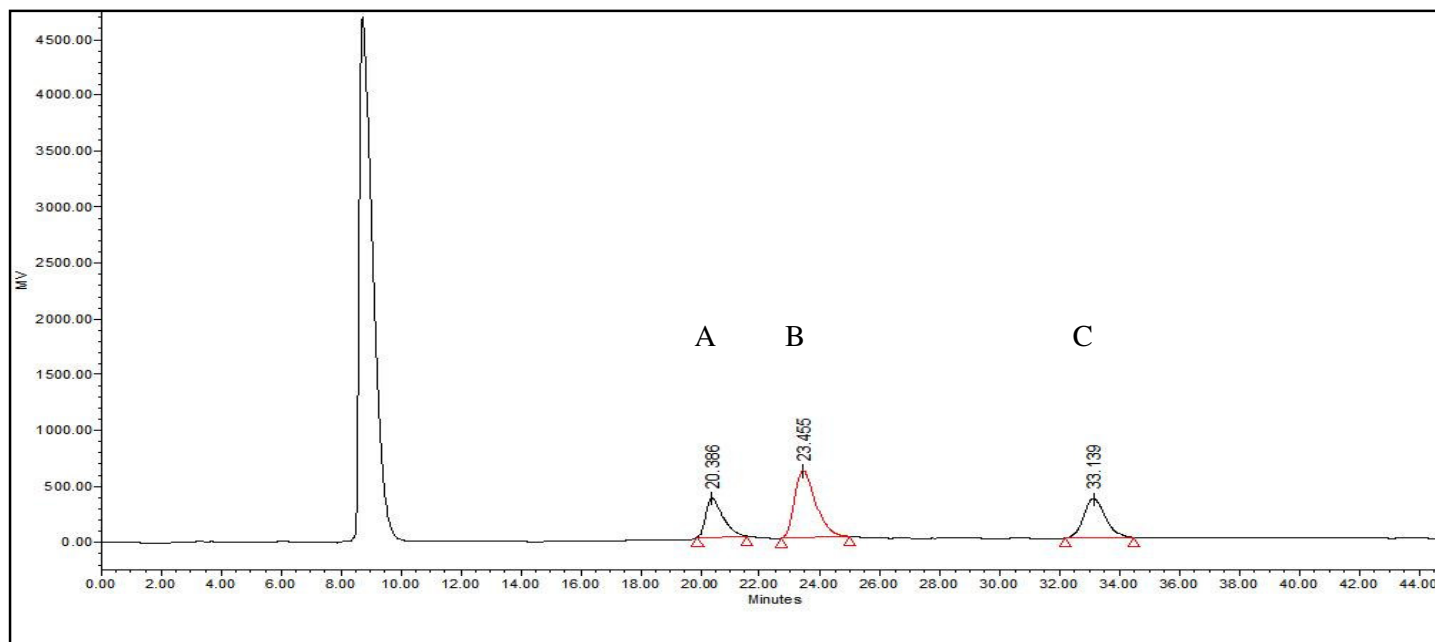
การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาลในใบและรากหม่อนหลังจากได้รับความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 100, 300, 500 และ 600 มิลลิโมลาร์ในเวลาต่างๆ ด้วยเทคนิค HPLC และใช้คอลัมน์ Hypersil APS-2 (5 ไมโครเมตร, 300 x 4.6 มิลลิเมตร) โดยมี 85% acetonitrile เป็นส่วนที่เคลื่อนที่ มีอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 45 นาที เปรียบเทียบกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน 4 ชนิด คือน้ำตาลฟรุกโตส ซูโครส แมนนิทอลและกลูโคส ดังในโครมาโตแกรมในภาพที่ 23 จากโครมาโตแกรมพบว่าไม่สามารถแยกชนิดของน้ำตาลแมนนิทอลและกลูโคสได้เนื่องจากน้ำตาลทั้งสองมี retention time ที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้น peak ของน้ำตาลทั้งสองชนิดจึงรวมเป็น peak เดียวกันโดยน้ำตาลฟรุกโตส แมนนิทอลกับกลูโคส และซูโครส มี retention time 20.4, 23.4 และ 33.1 นาทีตามลำดับ จากการวิเคราะห์น้ำตาลในหม่อนพบว่าเมื่อหม่อนได้รับความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ หม่อนจะมีการสร้างน้ำตาลทั้ง 4 ชนิดไว้ในใบมากขึ้น ขณะที่รากไม่พบการสร้างน้ำตาลชนิดใดเลย การหาปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสในใบหม่อนดังภาพที่ 24 (A) ปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสที่พบในใบหม่อนชุดควบคุม (ไม่มีเกลือ) ที่เวลาต่างๆ พบว่ามีปริมาณอยู่ระหว่าง 0 – 0.1 มิลลิกรัม เมื่อเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าหม่อนมีการสร้างน้ำตาลฟรุกโตสเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุมตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 โดยมีปริมาณอยู่ระหว่าง 0 – 0.3 มิลลิกรัม เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เป็น 300 มิลลิโมลาร์ พบว่าปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสในใบหม่อนเพิ่มสูงกว่าชุดควบคุมในชั่วโมงที่ 24 และมีปริมาณอยู่ระหว่าง 0 – 0.4 มิลลิกรัม ในขณะที่หม่อนที่ได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ มีปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสเพิ่มสูงกว่าชุดควบคุมตั้งแต่ชั่วโมงแรก และมีปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสสูงสุดในวันที่ 7 โดยมีปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสในช่วง 0 – 0.4 มิลลิกรัม ส่วนหม่อนที่ได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 600 มิลลิโมลาร์ พบว่าหม่อนมีการสร้างน้ำตาลฟรุกโตสเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนสูงสุดในวันที่ 5 จึงลดต่ำลง โดยมีปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสอยู่ระหว่าง 0 – 0.6 มิลลิกรัม

การหาปริมาณน้ำตาลซูโครสในใบหม่อนดังภาพที่ 24 (B) พบว่าในช่วง 12 ชั่วโมงแรกหม่อนไม่มีการสร้างน้ำตาลซูโครสเลยในทุกตัวอย่างยกเว้นที่ในชุดการทดลองที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 600 มิลลิโมลาร์ โดยหม่อนในชุดควบคุม (ไม่มีเกลือ) จะเริ่มการสร้างน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงที่ 24 และมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 7 โดยมีปริมาณอยู่ระหว่าง 0 – 0.2 มิลลิกรัม เมื่อ

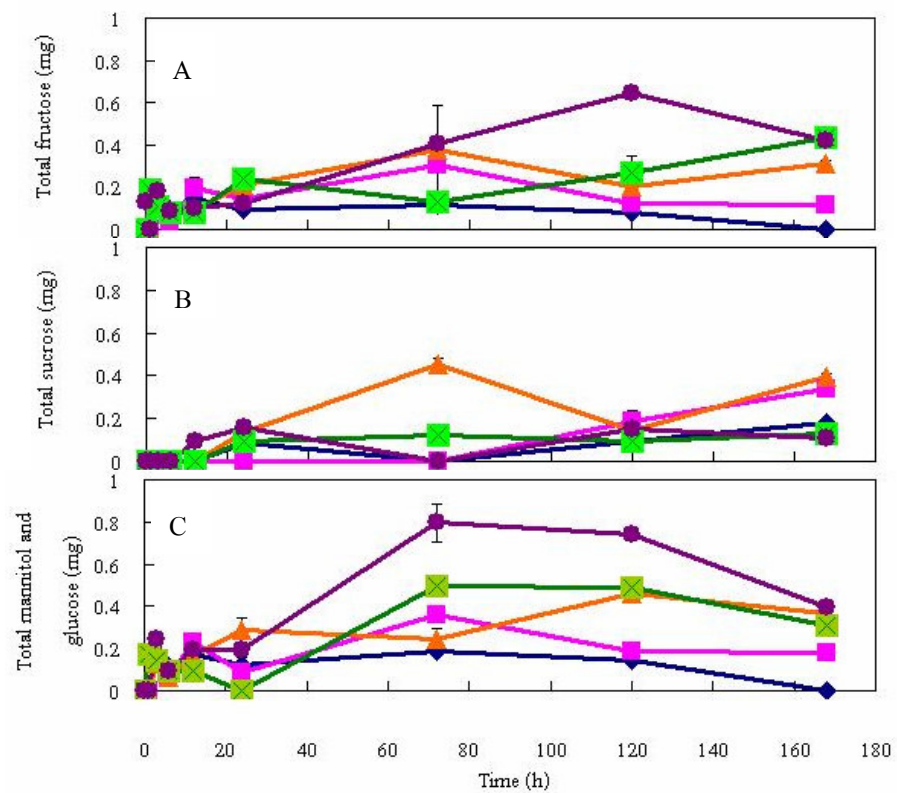
เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าหม่อนมีการสร้างน้ำตาลซูโครสเพิ่มขึ้นในวันที่ 3 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยมีปริมาณอยู่ระหว่าง 0 – 0.3 มิลลิกรัม เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เป็น 300 มิลลิโมลาร์ พบว่าปริมาณน้ำตาลซูโครสในใบหม่อนเพิ่มสูงกว่าชุดควบคุมในช่วง 24 ชั่วโมงที่ 24 และเพิ่มสูงสุดในวันที่ 3 จากนั้นจะลดลงและเพิ่มขึ้นอีกในวันที่ 5 และ 7 ตามลำดับ โดยมีปริมาณอยู่ระหว่าง 0 – 0.4 มิลลิกรัม ในขณะที่หม่อนที่ได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ มีการสร้างน้ำตาลซูโครสใน 24 ชั่วโมงแรกและมีปริมาณน้ำตาลซูโครสค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 7 มีปริมาณน้ำตาลซูโครสในช่วง 0 – 0.1 มิลลิกรัม ส่วนหม่อนที่ได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 600 มิลลิโมลาร์ พบว่ามีการสร้างน้ำตาลซูโครสในช่วง 12 ชั่วโมงที่ 12 และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วง 24 ชั่วโมงที่ 24 จากนั้นจะลดลงในวันที่ 3 แต่จะเพิ่มขึ้นอีกครั้งในวันที่ 5 โดยมีปริมาณน้ำตาลซูโครสอยู่ระหว่าง 0 – 0.2 มิลลิกรัม

ส่วนปริมาณน้ำตาลแมนนิทอลและกลูโคส ที่พบในใบหม่อนชุดควบคุม (ไม่มีเกลือ) ที่เวลาต่างๆ ดังภาพที่ 24 (C) พบว่ามีปริมาณอยู่ระหว่าง 0 – 0.2 มิลลิกรัม เมื่อเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าหม่อนมีการสร้างน้ำตาลแมนนิทอลและกลูโคสลดลงในช่วง 24 ชั่วโมงแรกเมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่ปริมาณน้ำตาลแมนนิทอลและกลูโคสจะเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 3 และลดลงเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 7 โดยมีปริมาณอยู่ระหว่าง 0 – 0.4 มิลลิกรัม เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เป็น 300 มิลลิโมลาร์ พบว่าปริมาณน้ำตาลแมนนิทอลและกลูโคสในใบหม่อนลดลงกว่าชุดควบคุมใน 12 ชั่วโมงแรกแต่จะเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 3 และมีปริมาณอยู่ระหว่าง 0 – 0.5 มิลลิกรัม ในขณะที่หม่อนที่ได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ปริมาณน้ำตาลแมนนิทอลและกลูโคสจะค่อยๆ ลดลงเรื่อยๆ ในช่วงวันแรก แต่จะเพิ่มสูงสุดในวันที่ 3 และลดลงอีกจนถึงวันที่ 7 โดยมีปริมาณอยู่ระหว่าง 0 – 0.5 มิลลิกรัม ส่วนหม่อนที่ได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 600 มิลลิโมลาร์ พบว่าหม่อนมีการสร้างน้ำตาลแมนนิทอลและกลูโคสเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนสูงสุดในวันที่ 5 จึงลดต่ำลง โดยมีปริมาณน้ำตาลแมนนิทอลและกลูโคสอยู่ระหว่าง 0 – 0.8 มิลลิกรัม

โดยสรุปพบว่าปริมาณน้ำตาลทั้ง 4 ชนิดเพิ่มขึ้น เมื่อได้รับความเครียดจากเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ และพบว่าการผลิตน้ำตาลซูโครสน้อยกว่าน้ำตาลฟรุกโตส แมนนิทอลและกลูโคส นอกจากนี้ยังพบน้ำตาลเดี่ยวชนิดอื่นหรืออนุพันธ์ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดอื่น (Yancey et al., 1982; Chen and Murata, 2000) ที่มี retention time น้อยกว่าน้ำตาลฟรุกโตสในปริมาณที่สูงกว่าน้ำตาลทั้ง 4 ชนิดที่ศึกษาอีกด้วย ดังนั้นจึงไม่สามารถระบุชนิดของน้ำตาลที่เคลื่อนที่เร็วกว่าน้ำตาลฟรุกโตสได้



ภาพที่ 23 โครมาโตแกรมของน้ำตาลมาตรฐาน 4 ชนิด คือ น้ำตาลฟรุกโตส (A) น้ำตาลแมนนิทอลและกลูโคส (B) และน้ำตาลซูโครส (C)

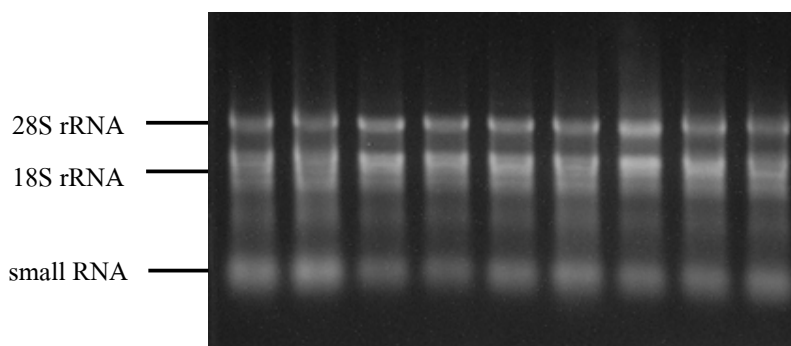


ภาพที่ 24 ปริมาณน้ำตาลฟรุกโตส (A) น้ำตาลซูโครส (B) น้ำตาลแมนนิทอลและกลูโคส (B) ในไบโหม่อนเมื่อได้รับความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 (—◆—), 100 (—■—), 300 (—▲—), 500 (—■—) และ 600 mM (—◆—) เป็นเวลา 7 วัน

5. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับ RNA

5.1 การสกัด RNA

การสกัด total RNA จากใบหม่อนน้อย (*M. rotundiloba*) โดยใช้ TRIzol reagent โดยนำใบที่เก็บที่เวลา 0, 0.5, 1, 3, 6, 12, 24, 72, 120 และ 168 ชั่วโมง ภายหลังจากเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 300 และ 500 มิลลิโมลาร์ ตัวอย่างละ 100 มิลลิกรัม จำนวน 30 ตัวอย่าง และใช้เป็น template สำหรับทำ RT-PCR โดยมีอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 260/280 อยู่ระหว่าง 1.72 – 2.59 แสดงให้เห็นว่า RNA ที่สกัดได้ส่วนใหญ่มีคุณภาพดี แต่บางตัวอย่างที่อาจมีการปนเปื้อนบ้างเล็กน้อย และมีปริมาณ RNA อยู่ในช่วง 4.6- 53.7 ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิกรัม น้ำหนักสด ดังตารางที่ 3 เมื่อนำ RNA ไปแยกด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสพบว่า มีแถบของ 18S และ 28S rRNA ดังภาพที่ 19



ภาพที่ 25 ตัวอย่าง total RNA เมื่อแยกด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ total RNA ที่สกัดจากใบหม่อนน้อย (*M. rotundiloba*) 10 ไมโครกรัม ใน 1% อะกาโรสเจลที่มี MOPS buffer ที่ 100 โวลต์ 30 นาที และย้อมด้วยเอทิดีอิมโบรไมด์

ตารางที่ 8 ปริมาณและคุณภาพของ RNA ทั้งหมดที่สกัดจากใบหม่อนน้อยที่ได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 300 และ 500 มิลลิโมลาร์ ในเวลาต่างๆ

Time (h)	Concentration of NaCl (mM)	A260/A280	RNA $\mu\text{g}/100 \text{ mg tissue}$
0	0	1.892	10.0
	300	1.916	30.4
	500	2.019	15.3
0.5	0	2.077	22.2
	300	2.000	14.0
	500	1.900	7.9
1	0	1.842	4.7
	300	1.975	11.0
	500	1.932	12.0
3	0	1.984	18.2
	300	1.958	5.8
	500	2.100	18.0
6	0	1.820	53.7
	300	2.194	31.0
	500	1.987	28.5
12	0	2.122	22.6
	300	1.716	17.8
	500	1.897	7.8
24	0	2.023	13.0
	300	1.971	9.3
	500	1.986	18.5
72	0	2.353	21.3
	300	2.235	5.6
	500	2.318	7.3
120	0	2.435	7.1
	300	2.515	10.0
	500	2.514	12.2
168	0	2.593	9.9
	300	2.452	34.9
	500	2.304	24.5

5.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค RT-PCR

5.2.1 การแสดงออกของยีนเลคตินในใบหม่อน

cDNA ที่ได้จากการถอดรหัสจาก RNA เมื่อนำมาเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนเลคตินโดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งจะได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 356 bp และใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจาก 26S rRNA ซึ่งเป็น housekeeping genes เป็นชุดควบคุมและมีแถบดีเอ็นเอขนาด 250 bp (ภาพที่ 20 E) โดยยีนเลคติน (ภาพที่ 20 A) ที่ได้รับความเครียดจากเกลือความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ มีการแสดงออกลดลงในช่วงวันที่ 3-7 ในขณะที่ต้นที่ได้รับเกลือ 300 มิลลิโมลาร์ มีการแสดงออกของยีนลดลงในครึ่งชั่วโมงแรกและชั่วโมงที่ 12

ในขณะที่เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนใน 48 ชั่วโมงที่ความเข้มข้นเกลือ 0, 50, 100, 200 และ 500 มิลลิโมลาร์ ดังภาพที่ 21 พบว่าเมื่อหม่อนได้รับเกลือที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ จะมีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เป็น 100 มิลลิโมลาร์ การแสดงออกของยีนกลับลดลง และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือเป็น 200 มิลลิโมลาร์ พบว่าการแสดงออกของยีนลดลง ในขณะที่การแสดงออกยีนที่ได้รับเกลือเข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ กลับเพิ่มสูงขึ้นเล็กน้อย

5.2.2 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความเครียดจากเกลือในใบหม่อน

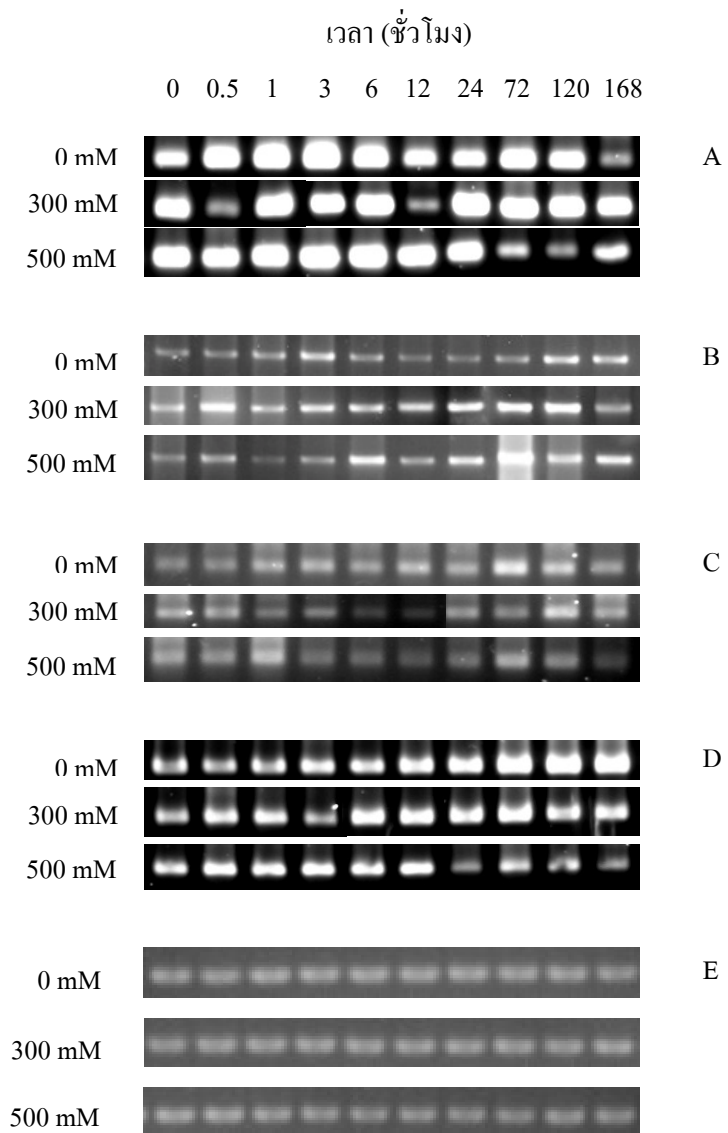
การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความเครียดจากเกลือในใบหม่อนพบว่า มีบางยีนที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้คือ invertase gene (Inv), D-mannitol dehydrogenase gene (ManD), putative late-embryogenesis-abundant (LEA) gene และ betain aldehyde dehydrogenase gene (BADH) ในขณะที่ fructose 1,6-bisphosphatase gene (FBP) pyrroline-5-carboxylase synthetase gene (P5CS) และ pyrroline-5-carboxylase reductase gene (P5CR) มีการแสดงออกที่แตกต่างกันไป

การแสดงผลการแสดงออกของยีน P5CS (ภาพที่ 20 B) ที่ได้รับเกลือเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในครึ่งชั่วโมงแรกอย่างชัดเจน แต่ในชั่วโมงถัดไปการแสดงออกจะค่อยๆ ลดลง แต่จะเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยจนมากสุดในวันที่ 5 และลดลงในวันที่ 7 ส่วนการแสดงออกของยีน

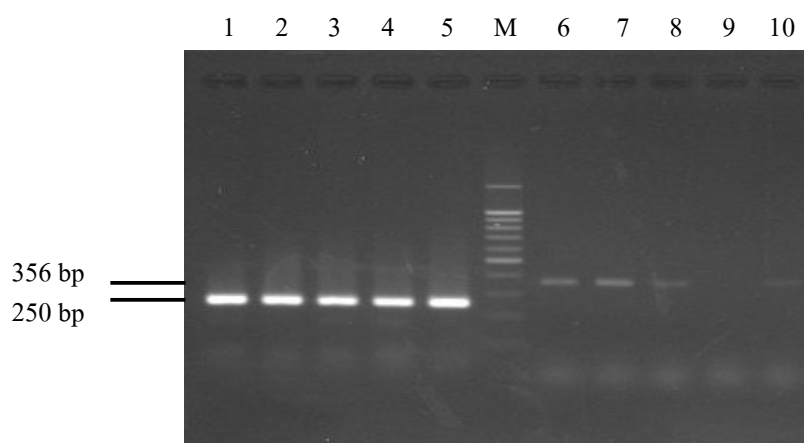
เมื่อได้รับเกล็ด 500 มิลลิโมลาร์ มีการแสดงออกที่ชัดเจนในช่วงเวลาที่ 6 และมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนสูงสุดในวันที่ 3

ยีน P5CR (ภาพที่ 20 C) มีการแสดงออกไม่ชัดเจนนัก โดยต้นที่ได้รับเกล็ดเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ ในช่วงช่วงแรกถึงช่วงเวลาที่ 12 การแสดงออกของยีนค่อยๆ ลดลงอย่างต่อเนื่อง แต่หลังจากนั้นในช่วงเวลาที่ 24 กลับมีการแสดงออกของยีนเพิ่มสูงขึ้น ส่วนต้นที่ได้รับเกล็ดเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ มีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นในช่วงเวลาที่ 1 และเริ่มลดลงในช่วงต่อมาเรื่อยๆ จนกระทั่งในวันที่ 3 จึงมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น

การแสดงออกของยีน FBP (ภาพที่ 20 D) ในชุดควบคุมจะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น โดยมีการแสดงออกมากที่สุดในช่วงวันที่ 3-7 เมื่อได้รับเกล็ดที่ความเข้มข้น 300 และ 500 มิลลิโมลาร์ พบว่าการแสดงออกของยีนนี้จะลดลงตามความเข้มข้นของเกล็ดที่เพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 3-7 ในขณะที่ความเข้มข้นเกล็ด 500 มิลลิโมลาร์ ในช่วงวันแรกมีการแสดงออกของยีนมากกว่าช่วง 6 วันสุดท้าย



ภาพที่ 26 การแสดงออกของยีนต่างๆ ในใบหม่อนได้แก่ ยีนเลคติน (A), pyrroline-5-carboxylase synthetase gene (P5CS) (B), pyrroline-5-carboxylase reductase gene (P5CR) (C) และ fructose 1,6-bisphosphatase gene (FBP) (D) หลังจากได้รับความเครียดจากเกลือ โซเดียม คลอไรด์ในเวลาต่างๆ โดยเปรียบเทียบกับยีน 26S rRNA (E) เป็นชุดควบคุม



ภาพที่ 27 การแสดงออกของยีนเลคตินในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลนที่ M คือ 100 bp + 1.5 kb DNA ladder เลนที่ 1 คือยีน 26S rRNA ในหม่อนที่ได้รับเกลือเข้มข้น 0 mM เลนที่ 2 คือยีน 26S rRNA ในหม่อนที่ได้รับเกลือเข้มข้น 50 mM เลนที่ 3 คือยีน 26S rRNA ในหม่อนที่ได้รับเกลือเข้มข้น 100 mM เลนที่ 4 คือยีน 26S rRNA ในหม่อนที่ได้รับเกลือเข้มข้น 200 mM เลนที่ 5 คือยีน 26S rRNA ในหม่อนที่ได้รับเกลือเข้มข้น 400 mM เลนที่ 6 คือยีนเลคตินในหม่อนที่ได้รับเกลือเข้มข้น 0 mM เลนที่ 7 คือยีนเลคตินในหม่อนที่ได้รับเกลือเข้มข้น 50 mM เลนที่ 8 คือยีนเลคตินในหม่อนที่ได้รับเกลือเข้มข้น 100 mM เลนที่ 9 คือยีนเลคตินในหม่อนที่ได้รับเกลือเข้มข้น 200 mM และเลนที่ 10 คือยีนเลคตินในหม่อนที่ได้รับเกลือเข้มข้น 400 mM

วิจารณ์

ดินเค็มเป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้ผลผลิตทางการเกษตรลดลง ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะแก้ปัญหาโดยการผลิตพืชทนเค็มให้สามารถเจริญเติบโตในพื้นที่ดินเค็มได้ (Flower, 2004) การศึกษากลไกการปรับตัวของหม่อนเมื่อได้รับความเครียดจากเกลือ โดยเลือกใช้หม่อนพันธุ์พื้นเมืองของไทยคือหม่อนน้อย ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ทนแล้งได้ดี (Iwata, 1972) โดยนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เพื่อความสะดวกในการควบคุมปัจจัยแวดล้อมที่อาจมีผลต่อการทดลอง และหาสภาพที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหม่อน โดยการหาปริมาณน้ำตาลและฮอร์โมน BAP ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของหม่อนไปพร้อมกันด้วย จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า น้ำตาลทรายในท้องตลาดให้ผลการเจริญเติบโตที่ไม่ต่างจากน้ำตาลซูโครสมากนัก ดังนั้นหากเกษตรกรหรือผู้ที่สนใจการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหม่อนต้องการลดต้นทุนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็สามารถใช้น้ำตาลทรายในท้องตลาดแทนน้ำตาลซูโครสได้ ส่วนปริมาณฮอร์โมน BAP ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่เร่งให้เกิดการแตกยอดใช้สำหรับสูตรที่ต้องการขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณต้นหม่อน ปริมาณฮอร์โมน BAP ที่เหมาะสมคือ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการศึกษาความเครียดจากเกลือเลือกใช้ต้นหม่อนที่มีอายุ 20 วัน เนื่องจากเป็นช่วงอายุที่หม่อนเริ่มชะลอการเจริญเติบโต จากนั้นจึงย้ายหม่อนมาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมแต่เปลี่ยนจากอาหารแข็งเป็นเวอร์มิคูไลท์แทน เพื่อให้รากหม่อนสามารถชอนไชและสัมผัสกับอากาศได้เหมือนกับอยู่ในดินจริงๆ (Tsong *et al.*, 2000) ซึ่งเหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษากลไกการปรับตัวของหม่อนเมื่อได้รับความเครียดจากเกลือ โดยการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 100, 300, 500 และ 600 มิลลิโมลาร์ ลงในอาหารสูตรเดิมที่ไม่มีน้ำตาล เนื่องจากต้องการให้พืชสังเคราะห์แสงด้วยตัวเอง และตอบสนองต่อความเค็มด้วยกลไกที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงเหมือนในธรรมชาติ

ความเครียดจากเกลือมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช ทำให้เกิดไอออนที่เป็นพิษขึ้น (Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-}) และเกิดความเครียดจากการขาดน้ำ (osmotic stress) สารอาหารและสมดุลของกระบวนการเผาผลาญ (Zhu, 2002) และเมื่อเกิดการขาดน้ำก็จะทำให้ปากใบปิด กระบวนการหายใจและการสังเคราะห์แสงลดลงจนเกิด oxidative stress ตามมาในที่สุด (Giridarakumer *et al.*, 1999) และ ROS นี้เองที่ทำให้เกิด oxidative damage ขึ้นโดยจะไปทำลายส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์ เช่น ผนังเมมเบรนที่เป็นไขมัน โปรตีน และกรดนิวคลีอิก (Halliwell and Gutteridge, 1986) เพื่อลดความเสียหายที่เกิดจาก oxidative damage พืชจะสร้าง antioxidants เช่น reduced glutathione (GSH)

และเอนไซม์ต่างๆ เช่น superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), glutathione-S-transferase (GST) และ glutathione peroxidase (GPX) เพื่อกำจัด ROS ที่เกิดขึ้น (Hussain *et al.*, 2008) เอนไซม์ peroxidase เป็นส่วนหนึ่งของเอนไซม์ป้องกันที่ช่วยในการกำจัดสารพิษที่อยู่ในรูป activated oxygen โดยจะช่วยกำจัด hydrogen peroxide จากการทดลองศึกษา กิจกรรมของออกซิเดทีฟเอนไซม์บางชนิด คือ peroxidase พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นทั้งในใบและรากของหม่อน โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นเกลือ 300 และ 500 มิลลิโมลาร์ พบว่ามีเอนไซม์ acidic peroxidase และ neutral peroxidase เพิ่มขึ้น โดยคาดว่าเป็นเอนไซม์ทั้งสองชนิดเป็นเอนไซม์ที่อยู่บริเวณแคว้นโอลและไซโตพลาสซึมตามลำดับ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ neutral peroxidase สูงสุดในใบ ขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ basidic peroxidase ทั้งในใบและราก ซึ่งคาดว่าเป็นเอนไซม์ที่อยู่บริเวณผนังเซลล์ มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น Sudhakar *et al.* (2001) ได้รายงานถึงการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase และ catalase ในหม่อน *M. alba* โดยเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ทนเค็มกับพันธุ์ไม่ทนเค็ม พบว่าอัตราการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ทั้งสองขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับความเครียด และพันธุ์ที่ทนเค็มจะมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าพันธุ์ไม่ทนเค็ม นอกจากนี้ยังมีหลักฐานว่าระดับของ antioxidant มีความสัมพันธ์กับความทนต่อความเครียดของพืช ในใบหม่อนพันธุ์ที่ทนต่อความเครียดได้ดีจะพบกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase สูงกว่าพันธุ์ที่ไม่ทนต่อความเครียด (1.6 เท่าที่ความเข้มข้นเกลือ 1.5 % ในวันที่ 8) ทั้งนี้เพื่อเป็นการป้องกันตัวเองจากความเครียด (Sudhakar *et al.*, 2001)

เอนไซม์ที่ช่วยในการกำจัดสารพิษอีกชนิดคือ GST โดย glutathione จะหน้าที่หลักในการป้องกันต่อต้านการเกิด oxidative stress โดยลดจำนวน H_2O_2 ที่เกิดขึ้น (Foyer and Halliwell, 1976) จากการทดลองพบกิจกรรมของเอนไซม์ GST ทั้งในใบและรากหม่อน โดยพบกิจกรรมของเอนไซม์ GST ที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในใบหม่อนที่ได้รับเกลือเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ ส่วนในรากมีกิจกรรมของเอนไซม์ GST ในต้นที่ได้รับเกลือเข้มข้น 300 และ 500 มิลลิโมลาร์ สูงขึ้นเช่นเดียวกันแต่ไม่ชัดเจนเท่าที่ใบ ในขณะที่หม่อนที่ได้รับเกลือเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ มีกิจกรรมไม่แตกต่างจากหม่อนในชุดควบคุม สอดคล้องกับรายงานของ Sudhakar *et al.* (2001) ซึ่งศึกษาเอนไซม์ GST ในใบหม่อน *M. alba* โดยเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ทนเค็มกับพันธุ์ไม่ทนเค็ม พบว่าเมื่อได้รับความเครียดจากเกลือ 1.5 % พันธุ์ทนเค็มมีกิจกรรมเพิ่มสูงขึ้น 16 เท่าสูงกว่าพันธุ์ไม่ทนเค็มซึ่งมีกิจกรรมเพิ่มสูงขึ้นเพียง 13 เท่า

เอนไซม์ ATPase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการรักษาสมดุลของไอออนในเซลล์ จากผลการทดลองโดยวัดกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมดในเซลล์ (ATPase) และในแวคิวโอล (V-ATPase) พบว่ากิจกรรมของ ATPase ที่รากสูงมากกว่าในใบ จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าในสภาวะปกติแทบจะไม่มีการทำงานของ ATPase เลย แต่เมื่อได้รับความเครียดจากเกลือ หม่อนจะมีการปรับตัวเพื่อรักษาสมดุลไอออนที่บริเวณรากซึ่งเป็นบริเวณที่เซลล์รากหม่อนได้สัมผัสกับเกลือโดยตรง และยิ่งความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้นก็จะมีการทำงานของ ATPase ที่สูงขึ้นด้วยโดยเฉพาะที่ความเข้มข้นเกลือ 500 มิลลิโมลาร์ มีกิจกรรมของ ATPase เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ในขณะที่ความเข้มข้นเกลือ 600 มิลลิโมลาร์ กลับไม่เป็นไปตามแนวโน้มในการตอบสนองต่อความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากความเข้มข้นของเกลือที่สูงมากไปทำลายกลไกการทำงานของเซลล์ทำให้เซลล์บางส่วนตายไป ดังนั้นการผลิตสารต่างๆ ภายในเซลล์จึงน้อยลงไปด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานเกี่ยวกับยีน H^+ -ATPase ในแวคิวโอลของ *M. crysfallinum* ซึ่งประกอบด้วย 3 subunits คือ subunits A, B และ C เมื่อเหนี่ยวนำด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 3, 8 และ 24 ชั่วโมง พบว่าในรากและใบอ่อนมีระดับของ mRNA เพิ่มขึ้นทั้ง 3 subunits ประมาณ 2 เท่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ในขณะที่ใบแก่มีเพียง subunits C เท่านั้นที่มีการตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือ (Low *et al.*, 1996) ส่วนในมันฝรั่ง (*Lycopersicon esculentum*) ได้มีการศึกษา cDNA ของยีน H^+ -ATPase ในราก ใบแก่และใบอ่อนในการตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือ พบว่ามีการแสดงออกของยีนในใบอ่อนมากกว่าในรากและใบแก่ (Kalampanayil and Wimmers, 2001)

นอกจากกลไกการป้องกันต่อความเครียดจากเกลียดังกล่าวข้างต้นแล้วพืชยังมีการตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือโดยการผลิตและสะสมสารที่อยู่ในกลุ่มของ osmoprotective compounds โดยสาร osmolytes เหล่านี้จะช่วยรักษาสภาพของโปรตีนและโครงสร้างของเซลล์ และยังสามารถเพิ่มแรงดันออสโมติกในเซลล์ได้ด้วย (Yancey *et al.*, 1982)

เอนไซม์ glucosidase เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะไกลโคซิดิกระหว่างน้ำตาลกลูโคสสองโมเลกุล ซึ่งน้ำตาลจัดเป็นสารที่ช่วยรักษาสมดุลออสโมติกและโครงสร้างของเซลล์และโปรตีน (Chinnusamy *et al.*, 2005) จากการทดลองพบว่าเอนไซม์ glucosidase มีกิจกรรมสูงมากที่ใบ แต่ในรากกลับไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์เลย ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในหม่อนคือพบน้ำตาลเฉพาะที่บริเวณใบเท่านั้น แสดงให้เห็นว่าหม่อนเลือกใช้กลไกในการรักษาความสมดุลออสโมติกที่ใบ แต่เลือกใช้กลไกการรักษาสมดุลไอออนในราก การสะสมของสาร

compatible solutes จะช่วยรักษาและป้องกันสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ไม่ให้มารบกวนการทำงานของเซลล์ (Stewart and Lee, 1974)

จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในหม่อนพบว่าเมื่อหม่อนรับความเครียดจากเกลือ หม่อนจะมีการสะสมของน้ำตาลไว้ในใบ แต่ไม่สะสมไว้ในราก โดยน้ำตาลที่มีการสะสมเพิ่มขึ้นคือ น้ำตาลฟรุกโตส แมนนิทอลและกลูโคส ในขณะที่น้ำตาลซูโครสมีปริมาณการสะสมน้อยกว่า น้ำตาลชนิดอื่น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานในผักกั้นน้ำฝรั่งว่าความเครียดจากเกลือสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ซูโครส แต่ไม่มีผลต่อเอนไซม์ที่สังเคราะห์แมนนิทอล แต่ในขณะเดียวกันอัตราการใช้แมนนิทอลจะลดลง (Buchana *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานใน umbu (*Spondias tuberosa*) เกี่ยวกับการสะสมของคาร์โบไฮเดรตที่เพิ่มขึ้นในลำต้นถึง 40 % เมื่อได้รับเกลือเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ความเข้มข้นของเกลือที่ 50, 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ส่วนในรากมีการสะสมของคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น 32 % ที่ความเข้มข้นของเกลือที่ 50, 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ใบพบการสะสมของคาร์โบไฮเดรตน้อยกว่าคือ 18 % และพบการสะสมของกรดอะมิโนในใบลดลงถึง 53 % ที่ความเข้มข้นเกลือ 100 มิลลิโมลาร์ แต่ในลำต้นกลับพบว่ามีการสะสมของกรดอะมิโนเพิ่มขึ้นถึง 110 % ที่ความเข้มข้นของเกลือที่ 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณระหว่างคาร์โบไฮเดรตกับกรดอะมิโนในใบและรากพบว่ามีการสะสมของคาร์โบไฮเดรตมากกว่ากรดอะมิโน 3 และ 87 เท่า ตามลำดับ (Silva *et al.*, 2008) นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลยังพบน้ำตาลชนิดอื่นที่มีไม่ใช่น้ำตาล 4 ชนิดที่ใช้ศึกษาซึ่งมีปริมาณที่สูงมาก ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าหม่อนอาจใช้น้ำตาลชนิดอื่นร่วมด้วยในการรักษาสภาพและแรงดันออสโมติกในเซลล์ด้วย ซึ่งควรจะทำการศึกษาต่อไป

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร osmoprotectants จะถูกควบคุมภายใต้ความเครียดจากเกลือ และความเข้มข้นของการสะสมสาร osmoprotectants มีความสัมพันธ์กับความทนต่อ osmotic stress (Zhu, 2002) จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน P5CS และ P5CR พบว่ามีการแสดงออกของยีน P5CS เพิ่มขึ้น ในขณะที่ยีน P5CR มีการแสดงออกที่ลดลงในบางช่วงเวลา ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kishor *et al.* (1995) ซึ่งทำการถ่ายยีน P5CS ลงในต้นยาสูบว่าทำให้มีการสะสม free proline เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว การที่ยีน P5CR ลดลงเป็นไปได้ว่าหม่อนอาจเลือกกลไกอีกอย่างในการผลิตโพรลีนคือผลิตจาก ornithine ดังภาพที่ 5 นอกจากนี้ยังมีหลักฐานว่า free proline จะไปยับยั้งยีน P5CS (Roosens *et al.*, 2000) และมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการสะสมของ free proline และเอนไซม์ P5CR, proline oxidase และ proline dehydrogenase (PDH) ในหม่อน (*M. alba*) พันธุ์ทน

เก็บกับพันธุ์ไม่ทนเก็บพบว่าพันธุ์ที่ทนเก็บจะมีการผลิต free proline เพิ่มมากกว่าพันธุ์ไม่ทนเก็บ และกิจกรรมของเอนไซม์ P5CR ก็เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของเกลือที่สูงขึ้นด้วยเช่นเดียวกัน ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ proline oxidase และ PDH ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สลาย proline จะถูกยับยั้ง (Kumar *et al.*, 2003)

การแสดงออกของยีน FBP ในหม่อนที่ได้รับเกลือความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ลดลงจากในช่วงวันแรก ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากการแสดงออกของยีนที่ลดลงส่งผลให้ไม่มีการสังเคราะห์เอนไซม์ fructose 1, 6-bisphosphatase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยนน้ำตาลฟรุกโตสไปเป็นกลูโคส

การแสดงออกของยีนเลคตินในการตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือพบว่าต้นหม่อนที่ได้รับจากความเครียดจากเกลือเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ มีการแสดงออกลดลงในช่วงวันที่ 3-7 ในขณะที่หม่อนที่ได้รับเกลือความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ มีการแสดงออกของยีนลดลงในครึ่งชั่วโมงแรก และชั่วโมงที่ 12 จากภาพที่ 21 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือให้สูงขึ้นที่ระดับหนึ่งยีนเลคตินจะถูกยับยั้งการทำงาน เช่นเดียวกับตัวเหลืองที่กำลังงอกเมื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นและลดลงเมื่อตัวเหลืองได้รับความเครียดจากเกลือ โดยพบว่าการสะสมเลคตินน้อยลงและนำไปได้ว่าไกลโคโปรตีนที่เป็นสารตั้งต้นจะถูกนำไปใช้ในการซ่อมแซมเมมเบรนที่เสียหายจากความเครียดที่ได้รับจากเกลือ (Aghaei *et al.*, 2008) โดยคาดว่าเลคตินมีบทบาทสำคัญในระบบป้องกันตัวของพืช และสามารถต่อต้านการรุกรานของสิ่งแปลกปลอมได้ (Peumans *et al.*, 1995)

ส่วนยีน Inv, ManD, LEA และ BADH ไม่สามารถเพิ่มปริมาณในหลอดทดลองได้ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากไพรเมอร์ที่ใช้ในการออกแบบเป็นพืชชนิดอื่นที่ไม่ใช่หม่อน เนื่องจากในหม่อนยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับยีนเหล่านี้ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าลำดับเบสของไพรเมอร์อาจจะไม่เหมาะสมกับหม่อน หรือตัวอย่างหม่อนที่เลือกใช้ทดสอบที่เลือกความเข้มข้นของเกลือ 300 และ 500 มิลลิโมลาร์ นั้นอาจไม่เหมาะสมกับการแสดงออกของยีนนี้ เช่นเดียวกับยีนเลคติน ซึ่งควรจะทำการศึกษาต่อไป

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหม่อนเพื่อขยายพันธุ์หม่อนในอาหารเลี้ยงสูตร MS ในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมง ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) อุณหภูมิ 25 °ซ ความชื้นสัมพัทธ์ 70-80 % ใช้น้ำตาล 3 % ฮอร์โมน BAP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และวุ้น 0.8 % นอกจากนี้ยังสามารถใช้น้ำตาลยี่ห้อมิตรผลหรือน้ำตาลทรายทั่วไปแทนน้ำตาลซูโครสได้ โดยน้ำตาลยี่ห้อมิตรผลทำให้หม่อนมีการเจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างจากน้ำตาลซูโครสมากนัก

2. การศึกษากลไกในการตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือในหม่อนน้อย (*Morus rotundiloba*) โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงสูตร MS ในขวดขนาด 120 มิลลิลิตร นาน 2 สัปดาห์ จากนั้นจึงย้ายมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีเวอร์มิคูไลต์เป็นวัสดุค้ำจุน 1 สัปดาห์จึงเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 100, 300, 500 และ 600 มิลลิโมลาร์ นาน 1 สัปดาห์ แล้วเก็บตัวอย่างใบและราก มาทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ น้ำตาลและการแสดงออกของยีนในระดับ RNA

2.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการทนเค็ม พบว่าที่ความเข้มข้นเกลือ 300 และ 500 มิลลิโมลาร์ มีกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidases, glucosidase, glutathione-S-transferase และ ATPases สูงกว่าในชุดควบคุมในขณะที่ความเข้มข้น 100 และ 600 มิลลิโมลาร์ มีกิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้ใกล้เคียงกับชุดควบคุมทั้งในใบและราก ดังนั้นหม่อนจะใช้การสังเคราะห์เอนไซม์ที่ต่อต้านการออกซิไดซ์ (peroxidase) เพื่อกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เป็นพิษต่อเซลล์ และใช้กลไกการกำจัดสารพิษโดยใช้การเชื่อมต่อสารพิษเข้ากับ glutathione เพื่อขนส่งออกนอกเซลล์หรือเก็บไว้ในแวคิวโอลต่อไปทั้งในใบและราก ในขณะที่หม่อนใช้กลไกในการปั๊มไอออนที่มากเกินไปออกจากเซลล์ด้วยโปรตีน ATPase ที่บริเวณรากที่เป็นบริเวณที่มีการสัมผัสกับไอออนของเกลือโดยตรง

2.2 การวิเคราะห์น้ำตาลซึ่งเป็นสาร osmoprotectants ในหม่อนเมื่อได้รับความเครียดจากเกลือ พบว่าหม่อนจะสะสมน้ำตาลมากกว่าในชุดควบคุม ซึ่งพบเฉพาะในใบ น้ำตาลที่พบได้แก่ น้ำตาลฟรุกโตส แมนนิทอล กลูโคส ซูโครสและน้ำตาลอื่นอีกอย่างน้อยหนึ่งชนิด และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ glucosidase ที่พบสูงขึ้นเฉพาะในใบ แสดงว่าในใบหม่อนจะมีกลไกในการรักษาสมดุลออสโมติกและรักษาสภาพเซลล์โดยการสร้างน้ำตาล

2.3 การศึกษาการแสดงออกของยีนเลคตินในใบหม่อน โดยใช้ตัวอย่างที่ได้รับเกลือเข้มข้น 0 – 500 มิลลิโมลาร์และยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการทนเค็มในระดับ RNA โดยเลือกวิเคราะห์เฉพาะตัวอย่างที่ได้รับเกลือที่ความเข้มข้น 300 และ 500 มิลลิโมลาร์

2.3.1 การแสดงออกของยีนเลคตินในใบหม่อน พบว่ายีนเลคตินในใบมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับเกลือเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ในเวลา 2 วัน จากนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเกลือให้สูงขึ้นพบว่าการแสดงออกของยีนลดลง

2.3.2 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการสังเคราะห์น้ำตาลและสาร osmoprotectant พบว่า fructose 1,6-bisphosphatase gene (FBP) ที่ความเข้มข้นเกลือ 500 มิลลิโมลาร์มีการแสดงออกลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ในขณะที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ invertase gene (Inv), D-manital dehydrogenase gene (ManD) และ betain aldehyde dehydrogenase gene (BADH) ในหลอดทดลองได้

2.3.3 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของโพรลีนพบว่า pyrroline-5-carboxylase synthetase gene (P5CS) มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น ในขณะที่ pyrroline-5-carboxylase reductase gene (P5CR) มีการแสดงออกลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

2.3.4 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องยีนที่มีการตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือ พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณ putative late-embryogenesis-abundant (LEA) gene ในหลอดทดลองได้

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษากลไกการปรับตัวของพืชเพื่อให้สามารถเข้ากับการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากความเค็มจากเกลือ โดยใช้เกลือเพียงชนิดเดียว (NaCl) เป็นตัวแทนเกลือจากธรรมชาติ อาจให้ผลการทดลองที่แตกต่างไปจากการทดลองในพื้นที่จริง เพราะในความเป็นจริงแล้วดินเค็มในธรรมชาติจะมีไอออนของเกลือผสมรวมกันอยู่หลายชนิด ไม่ได้มีเพียงเกลือชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น (Niazi *et al.*, 2004) การศึกษากลไกในการปรับตัวของพืชที่เกิดขึ้นจากความเครียดในพื้นที่จริงอาจทำได้ยากเนื่องจากไม่สามารถควบคุมปัจจัยอื่นที่อาจส่งผลต่อตัวแปรที่ต้องการได้ แต่วิธีการหนึ่งที่สามารถแก้ปัญหานี้ได้คือการใช้ดินจากพื้นที่จริงมาทำการทดลองในห้องปฏิบัติการที่สามารถควบคุมปัจจัยทางกายภาพได้

นอกจากนี้ควรมีการคัดเลือกพันธุ์หม่อนทนเค็ม เพื่อหาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทนเค็ม รวมถึงการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้ในการตรวจสอบความทนเค็มของหม่อนด้วย

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กลุ่มสื่อส่งเสริมการเกษตร ส่วนส่งเสริมการเกษตร. ม.ป.ป. **พืชทนเค็มและการปรับปรุงดินเค็ม.**
ฝ่ายโรงพิมพ์ สำนักพัฒนาการถ่ายทอดเทคโนโลยี กรมส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- สมศรี อรุณินท์. 2539. ดินเค็มในประเทศไทย. **กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์,**
กรุงเทพฯ.
- สมโพธิ อัครพันธุ์, ส่งรักษ์ เต็งรัตนประเสริฐ และ ปรีชา แต่งผิว. 2539. เอกสารแนะนำ การปลูก
หม่อนเลี้ยงไหม. สถานีทดลองหม่อนไหมอุบลราชธานี, สถาบันวิจัยหม่อนไหม, กรม
วิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.
- เสาวนีย์ ธรรมสคติ. 2545. **การทดลองการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์.** สถาบันวิจัยและพัฒนา
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล. โรงพิมพ์สถาบันพัฒนาสาธารณสุข
อาเซี่ยน, นครปฐม.
- Ashraf, M. and P.J.C. Harris. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in
plants. **Plant Sci.** 166: 3-16.
- Ayala, F., M. Ashraf and W. O'Leary. 1997. Plasma membrane H^+ -ATPase activity in salt-
tolerant and salt-sensitive lines of spring wheat (*Triticum aestivum* L.). **Acta. Bot.**
Neerl. 46: 315-324.
- Barbieri, L., GB. Batelli and F. Stirpe. 1993. Ribosome-inactivating proteins from plants.
Biochem. Biophys Acta. 1154: 237-282.
- Bourne, Y., V. Zamboni, A. Barre, W.J. Peumans, E.J.M. Van Damme and P. Rouge. 1999.
Helianthus tuberosus lectin reveals a widespread scaffold for mannose-binding lectins.
Structure 7: 1473-482.

- Buchana, B.B., W. Gruissem and R.L. Jones. 2002. **Biochemistry and Molecular Biology of plants**. 4th ed. Courier Companies, Inc., Maryland.
- Caponetti, J.D., D.J. Gray and R.N. Trigioana. 1996. History of plant tissue and cell culture, pp. 3-8. In D.J. Gray and R.N. Trigioana, eds. **Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercise**. CRC Press, Inc. New York.
- Chen, T.H.H., N. Murata. 2000. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. **Curr. Opin. Plant Biol.** 5: 250-257.
- Chinnusamy, V., A. Jagendorf and J.K. Zhu. 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. **Crop Sci.** 45: 437-448.
- Chinchiem, J. 1975. On the chemical composition of mulberry leaves in Thailand. **Bul. Thai Seri. Res. Train.** Center Korat, Thailand. 5: 30-31.
- Chingkitti, N., A. Promboon, S. Ratanapo. 2006. Mulberry leaf lectin gene: Intron and specific primer development, pp. 507-512. **The Proceedings of 44th Kasetsart University Annual Conference (Subject: Science)**. Kasetsart University, Bangkok.
- Chrispeels, M.J. and N. V. Raikhel. 1991. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. **Plant Cell** 3: 1-9.
- Ciopraga, J., O. Gozia, R. Tudor, L. Brezuica and R. J. Doyle. 1999. *Fusarium* sp. growth inhibitor by wheat germ agglutinin. **Biochem. Biophys. Acta.** 1428: 424-432.
- Crowe, J.H., L.M. Crowe and J.F. Carpenter. 1993. Preserving dry biomaterials: the water replacement hypothesis. **Biopharm.** 6: 40-43.

- Delauney, A.J. and D.P.S. Verma. 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **Plant J.** 4: 215-223.
- Dionisiosese, M.L. and S. Tobita. 1998. Antioxidant response of rice seedlings to salinity stress. **Plant Sci.** 135: 1-9.
- Does, M.P., P.M. Houterman, H. L. Dekker and Ben J.C. Cornelissen. 1999. Processing, targeting, and antifungal activity of stinging nettle agglutinin in transgenic tobacco. **Plant Physiol.** 120: 421-431.
- Dupont, F.M. 1992. Salt induced changes in ion transport: regulation of primary pumps and secondary transporters, pp. 91-100. In D.T. Cooke and D.T. Clarkson, eds. **Transport and Receptor Proteins of Plant Membranes, Molecular Structure and Function.** Plenum Press, New York.
- Flowers, P., F. Troke and A.R. Yeo. 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. **Annu. Rev. Plant Physiol.** 28: 89-121.
- _____, T.J. 2004. Improving crop salt tolerance. **J. Exp. Bot.** 55 : 307-319.
- Foyer, C. and B. Halliwell. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. **Planta** 133: 21-25.
- Goncalo, A., S. Filho, B.S. Ferreira, J.M. Dias, K.S. Queiroz, A.T. Branco, R.E. Bressan-Smith, J.G. Oliveira and A.B. Garcia. 2003. Accumulation of SALT protein in rice plants as a response to environmental stresses. **Plant. Sci.** 164: 623-628.
- Harinasut, P., D. Poonsapa, S. Srisunak, S. Pitukchaisopol and R. Charoensataporn 2000. Mechanisms of adaptation to increasing salinity of mulberry: Proline content and ascorbate peroxidase activity in leaves of multiple shoots. **Sci. Asia** 26: 207-211.

- _____, D. Poonsapa, K. Roengmonkol and R. Charoensataporn. 2003. Salinity effects on antioxidant enzymes in mulberry cultivar. **Sci. Asia** 29: 109-113.
- Hirano, K., T. Teraoka, H. Yamanaka, A. Harashima, A. Kunisaki, H. Takahashi and D. Hosokawa. 2000. Novel mannose-binding rice lectin composed of some isolectins and its relation to a stressinducible salT gene. **Plant Cell Physiol.** 41: 258-267.
- Getsang, T., K. Choowongkamon, A. Promboon and S. Ratanapo. 2006. Three dimensional structure of mulberry leaf lectin, pp. 513-519. **The Proceedings of 44th Kasetsart University Annual Conference (Subject: Science).** Kasetsart University, Bangkok.
- Getsang, T. 2007. **Expression of Recombinant Mulberry Leaf Lectin in Bacterial Host and Computational Structure Analysis.** M.D. thesis, Kasetsart university.
- Giridarakumer, S., A. Lakshmi, K.V. Madhusudhan, S. Ramanjulu and C. Sudhakar. 1999. Photosynthesis parameters In two cultivars of mulberry differing in salt tolerance. **Photosynthica.** 36: 611-616.
- Goldstein, I.J., and R.D. Poretz. 1986. Isolation, Physicochemical Characterization, and Carbohydrate-Binding Specificity of Lectins, pp. 33-327. In I.E. Liener, N. Sharon and I.J. Goldstein, eds. **The Lectins: Properties Functions and Applications.** Biology and Medicine Academic Press, Orlando.
- Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge. 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch. Biochem.Biophys.** 246: 501-514.
- Hideki, N., T. Horie, I. Yonamine, A. Shinmyo and K. Yoshida1. 2005. Improving salt tolerance in plant cells. **Plant Biotechnol.** 22: 477-487.

- Hirayama, C., K. Konno, N. Wasano, M. Nakamura. 2007. Differential effects of sugar-mimic alkaloids in Mulberry latex on sugar metabolism and disaccharidases of eri and domesticated silkworm: enzymatic adaptation of *Bombyx mori* to mulberry defense. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 37: 1348-1358.
- Hirt, H. 2004. Introduction, pp. 1-8. In H. Hirt and K. Shinozaki, eds. **Plant Responses to Abiotic Stress**. Springer Verlag, Berlin.
- Hopkins, W.G. 1999. **Introduction to Plant Physiology**. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Hossain, M.A., S.M. Rafiqul Islam and N. Absar. 2004. Purification and characterization of lectins from mulberry seeds (*Morus alba* L.). **Pak. J. Biol. Sci.** 7: 1808-1813.
- Hussain, T.M., T. Chandrasekhar, M. Hazara, Z. Sultan, B.K. Saleh and G.R. Gopal. 2008. Recent advances in salt stress biology: a review. **Biotechnol. Mol. Biol. Rev.** 3: 8-13.
- Itoi, S. and L. Boonnab. 1974. Root rot of mulberry in Thailand: Symptoms and varietal resistance of mulberry. **Bul. Thai Seri. Res. Train.** Center Korat, Thailand. 4: 104-109.
- Iwata, E. 1972. Survey on practical characters of Thai varieties of mulberry. **Bul. Thai Seri. Res. Train.** Center Korat, Thailand. 2: 16.
- Kalampanayil, B.D. and L.E. Wimmers, 2001. Identification and characterization of a salt-stress-induced plasma membrane H⁺-ATPase in tomato. **Plant Cell Environ.** 24: 999-1005.
- Kankamol, C. 2003. **Molecular Cloning and Expression of Mulberry Leaf Lectin (MLL) Genes**. Ph.D. thesis, Kasetsart university.

- Kishor, P.B.K., Z. Hong, G.H. Mial, C.A.A. Hu and D.P.S. Verma. 1995. Overexpression of 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. **Plant Physiol.** 108: 1387-1394.
- Kumar, S.G., A.M. Reddy and C. Sudhakar. 2003. NaCl effects on proline metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) with contrasting salt tolerance. **Plant Sci.** 165: 1245-1251.
- Lanka, S. 2001. Agrarian Reforms and Agricultural Productivity. In Chaudhry, M.G. ed. **Report of the APO Study Meeting on Agrarian Reforms and Agricultural Productivity.** Pakistan Institute of Development Economics, Islamabad, Pakistan.
- Larcher, W. 2003. **Physiological Plant Ecology: Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups** (translated from German). 4th ed. Springer Verlag, Berlin.
- Leaver, M.J., D.J. Clarke and S.G. George. 1992. Molecular studies of the phase II xenobiotic conjugative enzymes of marine Pleuronectid flatfish. **Aquat. Toxicol.** 22: 265–278.
- Low, R., B. Rockel, M. Kirsch, R. Ratajczak, S. Hortensteiner, E. Martinoia, U. Lüttge and T. Rausch. 1996. Early Salt Stress Effects on the Differential Expression of Vacuolar H⁺-ATPase Genes in Roots and Leaves of *Mesembryanthemum crystallinum*. **Plant Physiol.** 110: 259-265.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193:265–275.
- Lyman, E.S., L. Bin and V. Renganathan. 1995. Purification and characterization of a cellulose-binding β -Glucosidase from cellulose-degrading cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Environ. Microbiol.** 61:2976-2980.

- Maji, M.D. and S.M.H. Qadri. 1999. Bacterial disease of mulberry (*Morus* sp.). **Sericologia** 39 : 1-7.
- Mahuren, J.D., S.P. Coburn, A. Slominski and J. Wortsman. 2001. Microassay of phosphate provides a general method for measuring the activity of phosphatases using physiological, nonchromogenic substrates such as lysophosphatidic acid. **Anal. Biochem.** 298: 241-245.
- Mannervik, B. and C. Gutenber. 1981. Glutathione transferase (Human placenta). **Methods Enzymol.** 77: 231–235.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiol. Plant.** 15: 473-497.
- Murdock, L.L., J.E. Huesing, S.S. Nielsen, R.C. Parlt and R.E. Shade. 1990. Biological effect of plant lectins on the *Cowpea weevil*. **Phytochemistry** 29: 85-89.
- Nakano, Y., and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiol.** 22: 867–880.
- Niazi, B.H., M. Athar and J. Rozema. 2004. Salt tolerance in fodderbeet and seabee: analysis of biochemical relations. **Bulg. J. Plant Physiol.** 30 : 78-88.
- Parida, A.K. and A.B. Das. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 60 : 324-349.
- Peumans, W.J. and E.J.M. Van Damme. 1995. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.** 109: 347-352.

- _____, B. Hause and E.J.M. Van Damme. 2000. The galactose-binding and mannose-binding jacalin-related lectins are located in different sub-cellular compartments. **FEBS Lett.** 477: 186-192.
- _____, W. Zhang, A. Barre, C. Houles Astoul, P. J. Balint-Kurti, P. Rovira, P. Rouge, G. D. May, F. V. Leuven P. Truffa-Bachi and E.J.M. Van Damme. 2000. Fruit-specific lectin from banana and plantain. **Planta** 211: 546-554.
- Pusztai, A., S.W.B. Ewen, G. Grant, W.J. Peumans, E.J.M. Van Damme, L. Rubio and S. Bardocz. 1990. The relationship between survival and binding of plant lectins during small intestine passage and their effectiveness as growth factors. **Digestion** 46: 308-316.
- Raikhel, NV., HI. Lee and WF. Broekaert. 1993. Structure andf of chitin binding proteins. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 44: 591-615.
- Ratanachata, S. 1972. Some varietal characters of mulberries in Thailand. **Bul. Thai Seri. Res. Train.** Center Korat, Thailand. 4: 33-42.
- Ratanapo, S., W. Ngamjunyaporn and M. Chulavatnatol. 1998. Sialic acid binding lectins from leaf of mulberry (*Morus alba*). **Plant Sci.** 139: 141-148.
- _____, _____ and _____. 2001. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae pv mori*. **Plant Sci.** 160: 739-744.
- _____, Y. Thawalvichit and A. Promboon. 2005. Inhibitory effects of mulberry leaf lectins to silkworm proteases. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 39: 125-135.
- Roosens, N.H., R. Willem, Y. Li, I.I. Verbruggen, M. Biesemans and M. Jacobs. 2000. Proline metabolism in the wild-type and in a salt tolerant mutantof *Nicotiana plumbaginifolia* studied by $(13)^C$ –nuclear magnetic resonance imagine. **Plant Physiol.** 121: 1281-1290.

Rinderle, S.J., I.J. Goldstein, K.L. Matta and R.M. Ratcliffe. 1989. Isolation and characterization of amaranthin, a lectin present in the seeds of *Amaranthus caudatus*, that recognizes the T- (or cryptic T)-antigen. **J. Biol. Chem.** 264: 16123-16131.

Sagerstrom, C.S. and H.L. Sive. 1996. RNA Blot Analysis, pp. 83-103. In P.A. Krieg, ed. **A Laboratory Guide to RNA : Isolation, Analysis, and Synthesis**. John Wiley & Sons, Inc., Publication, New York.

Sairam, R. K. and A. Tyagi. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. **Curr. Sci.** 86: 407-421.

Sastry, M.V.K., P. Banerjee, S.R. Patanjali, G.V. Swarnalatha and A. Surolia. 1986. Analysis of the saccharide binding to *Artocarpus integrifolia* lectin reveals specific recognition of T-antigen (β -D-Gal (1,3) D-GalNAc). **J. Biol. Chem.** 210: 970-978.

Shimizu, T., M. Yasawa and N. Takeda. 1992. Aromatic amino acids in the leaves of *Morus alba* and their possible medicinal value. **Sericologia**. 32: 633-636.

Sharon, N. and H. Lis. 1990. Legume lectins – a large family of homologous proteins. **FASEB J.** 4: 3198-3208.

Silva, E.C., R.J.M.C. Nogueira, F.P. Araujo, N.F. Melo and A.D.A. Neto. 2008. Physiological responses to salt stress in young umbu plants. **Environ. Exp. Bot.** 63: 147-157.

Stewart, G.R. and J.A. Lee. 1974. The role of proline accumulation in halophytes. **Planta** 120: 279-289.

Subnis, D.D. and J.W. Hart. 1978. The isolation and some properties of a lectin (haemagglutinin) from *Cucurbita* phloem exudates. **Planta** 142: 97-101.

- Sudhakar, C., A. Lakshmi and S. Giridarakumar. 2001. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. **Plant Sci.** 161: 613-619.
- Taiz, L. and E. Zeiger. 1991. **Plant Physiology.** The Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc., California.
- Tewary, P.K., A. Sharma, M.K. Raghunath and A. Sarkar. 2000. In vitro response of promising mulberry (*Morus* sp.) genotypes for tolerance to salt and osmotic stress. **Plant Growth Regul.** 30: 17-21.
- Tsong, A.Y., S.D. Yeh, Y.H. Cheng and J.S. Yang. 2000. Efficient rooting for establishment of papaya plantlets by micropropagation. **Plant Cell** 61: 29-35.
- Turhan, E., H. Gulen and A. Eris. 2008. The activity of antioxidative enzymes in three strawberry cultivars related to salt-stress tolerance. **Acta. Physiol. Plant** 30: 201–208.
- United State Salinity Laboratory Staff. 1954. **Diagnosis and Improvement of Saline and Alkali Soil.** U.S. Dep. Agr., New York.
- Van Damme, E.J.M., K. Smith and W.J. Peumans. 1995. The Mannose-Binding Monocot Lectins and Their Genes, pp. 59-80. In A. Pusztai and S. Bardocz, eds. **Lectins Biomedical Perspectives.** Taylor and Francis, Inc., London.
- _____, A. Barre, P. Verhaert, P. Rouge and W.J. Peumans. 1996. Molecular cloning of the mitogenic mannose/maltose-specific rhizome lectin from *Calystegia sepium*. **FEBS Lett.** 397: 352-356.

- _____, _____, A.M. Mazard, P. Verhaert, A. Horman, H. Debray, P. Rouge and W.J. Peumans. 1999. Characterization and molecular cloning of the lectin from *Helianthus tuberosus*. **Eur. J. Biochem.** 259: 135-142.
- _____, B. Hause, J. Hu, A. Barre, P. Rouge, P. Proost and W.J. Peumans. 2002. Two distinct jacalin-related lectins with a different specificity and subcellular location are major vegetative storage proteins in the bark of the black mulberry tree. **Plant Physiol.** 130: 757-769.
- _____, A. Barre, P. Rouge and W.J. Peumans. 2004. Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story. **Trends Plant Sci.** 9: 484-489.
- Vijayan, K., S.P. Chakraborti and P.D. Ghosh. 2003. In vitro screening of mulberry (*Morus* spp.) for salinity tolerance. **Plant Cell Rep.** 22: 350-357.
- Williams, R.J. and A.C. Leopold. 1989. The glassy state in corn embryos. **Plant Physiol.** 89: 977-981.
- Wilson, C.W., P.E., Shaw and C.W., Campbell. 1982. Determination of organic acid and sugars in guava (*Psidium guajava* L.) cultivars by high-performance liquid chromatography. **J. Sci. Food Agric.** 33: 777-780.
- Yancey, P.H., M.E. Clark, S.C. Hand, R.D. Bowlus and G.N. Somero. 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte system. **Science** 217: 1214-1222.
- Yang, H. and T.H. Czaplak. 1993. Isolation and characterization of cDNA clones encoding jacalin isoelectins. **J. Biol. Chem.** 268: 5905-5910.

- Zhang, W., W.J. Peumans, A. Barre, C.H. Astoul, P. Rovira, P. Rouge, P. Proost, P. Truffa-Bachi, A.A. Jalali and E.J. Van Damme. 2000. Isolation and characterization of a jacalin-related mannose binding lectin from salt-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. **Planta** 210: 970-978.
- Zhu, J.K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.** 53: 247-273.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและสารเคมี

1. การเตรียมอาหารสูตร MS medium agar (Murashige and Skoog, 1962)

Stock	สารเคมี	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาตรที่ใช้ (มิลลิลิตรต่อลิตร)
1	Ammonium nitrate (NH_4NO_3)	16.50	100
	Potassium nitrate (KNO_3)	19.00	
	Calcium chloride ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	4.40	
	Magnesium sulfate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	3.70	
	Potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4)	1.70	
2	Manganese(II)sulfate ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	1.69	10
	Zinc sulfate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.86	
	Boric acid (H_3BO_3)	0.62	
3	Cobalt(II)chloride ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.0125	2
	Potassium iodide (KI)	0.4150	
	Copper(II)sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.0125	
	Sodium molybdate ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.1250	
4	Disodium ethylenediamine tetraacetic acid		5
	($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	7.45	
	Iron(II)sulfate $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.57	
	Nicotinic acid	0.20	10
	Pyridoxine hydrochloride	10.00	10
	Glycine	0.05	10
	Myo-inositol	0.05	10
	Thiamine hydrochloride	0.10	1
	6-Benzylaminopurine (BAP)	0.10	1
	Sucrose	30	-
	Agar	8	-

2. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

2.1 การเตรียม 0.2 M acetate buffer, pH 5

สารละลาย A : 0.2 M acetic acid (CH_3COOH)

ปิเปตต์ CH_3COOH 11.55 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

สารละลาย B : 0.2 M sodium acetate (CH_3COONa)

ชั่ง CH_3COONa 16.4 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ค่อยๆ เติมสารละลาย B ลงในสารละลาย A ทีละน้อยผสมให้เข้ากัน

และวัด pH ของสารละลายผสมไปเรื่อยๆ จนได้ pH 5 ด้วย pH meter

2.2 การเตรียม 0.2 M phosphate buffer, pH 7

สารละลาย A: 0.2 M monobasic sodium phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

ชั่ง $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 31.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

สารละลาย B: 0.2 M dibasic sodium phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

ชั่ง $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.65 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ค่อยๆ เติมสารละลาย B ลงในสารละลาย A ทีละน้อยผสมให้เข้ากัน

และวัด pH ของสารละลายผสมไปเรื่อยๆ จนได้ pH 7 ด้วย pH meter

2.3 การเตรียม 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 6.5

สารละลาย A: 0.1 M Tris: $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$

ชั่ง Tris 12.114 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

สารละลาย B: 0.1 M HCl

ปิเปตต์ HCl 8.06 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

ค่อยๆ เติมสารละลาย B ลงในสารละลาย A ทีละน้อยผสมให้เข้ากัน

และวัด pH ของสารละลายผสมไปเรื่อยๆ จนได้ pH 7 ด้วย pH meter

3. การเตรียมสารสำหรับวัดกิจกรรมของเอนไซม์

สารเคมีสำหรับวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ATPase ทั้งหมดในเซลล์

(3 mM ATP, 0.2 mM ammonium molybdate และ 5 mM magnesium sulfate)

ATP	82.7	มิลลิกรัม
Ammonium molybdate	12.0	มิลลิกรัม
Magnesium sulfate	62.0	มิลลิกรัม
ละลายสารเคมีใน 50 mM Tris-HCl buffer (pH 6.5) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร		

สารเคมีสำหรับวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ATPase ในแวคิวโอล

(3 mM ATP, 0.2 mM ammonium molybdate, 5 mM magnesium sulfate
และ 100 mM potassium nitrate)

ATP	82.7	มิลลิกรัม
Ammonium molybdate	12.0	มิลลิกรัม
Magnesium sulfate	62.0	มิลลิกรัม
Potassium nitrate	50.6	มิลลิกรัม
ละลายสารเคมีใน 50 mM Tris-HCl buffer (pH 6.5) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร		

การเตรียม color reagent

(8.5 mM ammonium molybdate, 1.62 mM malachite green, 200 mM perchloric acid และ
0.06 % tween 20)

Ammonium molybdate	2.10	กรัม
Malachite green	0.15	กรัม
Perchloric acid	4.4	มิลลิลิตร
Tween 20	0.12	มิลลิลิตร

ละลายสารเคมีในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนครบ 200 มิลลิลิตร

สารละลายที่ได้จะตกตะกอนจึงต้องกรองและควรใช้ทันที

สารเคมีสำหรับวัดกิจกรรมของเอนไซม์ glucosidase

(1 mM PNPG)

p-Nitrophenyl-2-D-glucopyranoside (PNPG) 30.0 มิลลิกรัม

ละลายสารเคมีใน 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

สารละลายสำหรับหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ glucosidase

(5 mM sodium carbonate)

Sodium carbonate 26.5 มิลลิกรัม

ละลายสารเคมีในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร

สารเคมีสำหรับวัดกิจกรรมของเอนไซม์ glutathione-S-transferase

(1 mM GSH และ 1 mM CDBN)

Glutathione (GSH) 30.7 มิลลิกรัม

1-Chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB) 20.2 มิลลิกรัม

ละลายสารเคมีใน 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)

ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

สารเคมีสำหรับวัดกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase

(2.358 mM guaiacol และ 0.174 mM hydrogen peroxide จาก stock 11.6 mM)

Guaiacol 29.0 มิลลิกรัม

Hydrogen peroxide 1.5 มิลลิลิตร

ละลายสารเคมีใน 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)

ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำทั้งหมด 3 ชุด โดยใช้วัดค่า pH 5, 7 และ 10

การเตรียมสารละลาย hydrogen peroxide

(11.6 mM hydrogen peroxide)

Hydrogen peroxide	13	ไมโครลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 มิลลิลิตร		

4. การเตรียมสารสำหรับงานด้านโมเลกุล

10 x MOPS buffer

(0.4 M Morpholinopropane sulfonic acid, 0.1 M Sodium acetate และ 10 mM Na₂ EDTA)

Morpholinopropane sulfonic acid	83.7	กรัม
Sodium acetate	13.6	กรัม
Na ₂ EDTA H ₂ O	1.87	กรัม
ปรับให้ได้ pH 7.2 ด้วย 1 M NaOH และเติม DDW ให้ครบ 1 ลิตร		

50 x TAE buffer (stock)

Tris base	240.2	กรัม
Glacial acetic acid	57.0	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH 8.0)	100.0	มิลลิลิตร
ละลายสารเคมีใน DDW และปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร		
(ความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้คือ 1 เท่า)		

Ethidium bromide (10 mg/ml)

Ethidium bromide	1.0	กรัม
DDW	10.0	มิลลิลิตร
เก็บสารละลายไว้ในที่มีดในอุณหภูมิห้อง		

6 x gel-loading dye buffer

0.25 % bromophenol blue,

0.25 % xylene cyanol FF

30 % glycerol

ละลายสารเคมีและปรับปริมาตรให้ครบด้วย DDW

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยใช้ BSA เป็นสารละลายมาตรฐาน

1.1 สารเคมี

1.1.1 ชั่งสารละลาย BSA ด้วยเครื่องชั่งสารอย่างละเอียด 0.2000 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร สำหรับใช้เป็น stock solution จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้สารละลายมาตรฐานที่มีปริมาณ BSA ตั้งแต่ 1 – 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

1.1.2 การเตรียมสารละลาย Lowry

สาร A: Copper-tartrate-carbonate (CTC) solution

- ละลาย copper sulfate 0.1 กรัม และ tartaric acid 0.2 กรัม
ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

- ละลาย sodium carbonate 40 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

ค่อยๆ เทสารละลาย sodium carbonate ลงใน copper sulfate-tartrate solution ช้าๆ โดยกวนสารละลายไปด้วย

สาร B: 0.8 M NaOH

สาร C: 5 % SDS

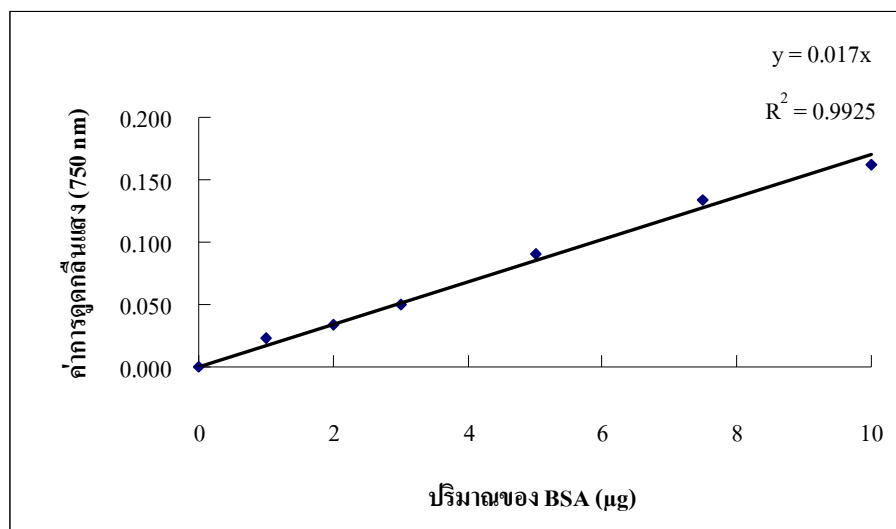
สาร D: สารผสม (อัตราส่วนของสาร A: B: C; 1: 1: 2, v/v/v)

สาร E: folin-ciocalteu phenol (อัตราส่วน folin: water; 1: 5, v/v)

1.2 วิธีการวิเคราะห์

1.2.1 สร้างกราฟมาตรฐานของ BSA โดยเจือจางสารละลายมาตรฐาน BSA ให้มีความเข้มข้น 1, 2, 3, 5, 7.5 และ 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน โดยให้แกน X เป็นไมโครกรัมโปรตีน ส่วนแกน Y เป็นค่าการดูดกลืนแสง

1.2.2 นำสารละลายตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับสาร D ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสาร E ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยใช้ 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 ซึ่งทำปฏิกิริยากับสารเคมีต่างๆ พร้อมกับสารตัวอย่างเป็นสารละลายเปล่า (blank) แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ BSA จากกราฟมาตรฐาน และคำนวณหาปริมาณโปรตีนที่มีในตัวอย่าง



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานของ Bovine serum albumin

ตารางภาคผนวก ข1 ปริมาณโปรตีนและค่าความจำเพาะของเอนไซม์ ATPase ในใบ

NaCl (mM)	Time (h)	Volume (μ l)	Total protein (mg)	ATPase		P-ATPase	
				Total	Specific	Total	Specific
				activity (units)	activity (units/mg)	activity (units)	activity (units/mg)
0	0	400	0.45	25.49	56.64	1.66	3.69
	1	400	0.36	22.50	62.50	0	0
	3	400	0.46	23.81	51.76	0	0
	6	400	0.51	21.15	41.47	0	0
	12	400	0.42	23.19	55.21	0	0
	24	400	0.31	25.54	82.39	0	0
	72	400	0.46	27.51	59.80	0	0
	120	400	0.43	25.62	59.58	0	0
	168	400	0.51	24.74	48.51	0.52	1.02
100	0	400	0.57	11.99	21.04	0	0
	1	400	0.43	11.43	26.58	0	0
	3	400	0.41	14.80	36.10	1.72	4.20
	6	400	0.60	11.01	18.35	0	0
	12	400	0.38	16.14	42.47	4.14	10.89
	24	400	0.49	12.00	24.49	0	0
	72	400	0.47	18.17	38.66	4.40	9.36
	120	400	0.46	14.72	32.00	1.88	4.09
	168	400	0.57	17.93	31.46	3.30	5.79
300	0	400	0.27	19.51	72.26	0	0
	1	400	0.22	16.52	75.09	0	0
	3	400	0.16	17.84	111.50	0	0
	6	400	0.20	15.17	75.85	0	0
	12	400	0.19	17.21	90.58	0	0
	24	400	0.23	19.57	85.09	0	0.00

ตารางภาคผนวก ข1 (ต่อ)

NaCl (mM)	Time (h)	Volume (μ l)	Total protein (mg)	ATPase		P-ATPase	
				Total	Specific	Total	Specific
				activity (units)	activity (units/mg)	activity (units)	activity (units/mg)
300	72	400	0.43	21.53	50.07	0	0
	120	400	0.29	19.65	67.76	0	0
	168	400	0.29	18.77	64.72	0	0
500	0	400	0.19	57.37	301.95	19.35	101.84
	1	400	0.15	63.69	424.60	22.65	151.00
	3	400	0.33	56.78	172.06	19.76	59.88
	6	400	0.33	52.76	159.88	12.93	39.18
	12	400	0.25	57.56	230.24	16.92	67.68
	24	400	0.25	53.03	212.12	18.96	75.84
	72	400	0.54	40.91	75.76	5.19	9.61
	120	400	0.43	50.78	118.09	16.03	37.28
	168	400	0.33	52.23	158.27	13.64	41.33
600	0	400	1.17	70.74	60.46	33.49	28.62
	1	400	1.25	73.47	58.78	39.64	31.71
	3	400	1.53	70.51	46.08	30.65	20.03
	6	400	1.65	66.63	40.38	27.41	16.61
	12	400	1.35	67.19	49.77	31.52	23.35
	24	400	1.70	62.83	36.96	32.76	19.27
	72	400	1.39	71.04	51.11	32.16	23.14
	120	400	1.52	63.57	41.82	30.72	20.21
	168	400	1.06	72.62	68.51	34.32	32.38

ตารางภาคผนวก ข2 ปริมาณ โปรตีนและค่าความจำเพาะของเอนไซม์ ATPase ในราก

NaCl (mM)	Time (h)	Volume (μ l)	Total protein (mg)	ATPase		P-ATPase	
				Total	Specific	Total	Specific
				activity (units)	activity (units/mg)	activity (units)	activity (units/mg)
0	0	400	0.11	41.41	373.06	17.70	159.46
	1	400	0.19	41.61	219.00	17.78	93.58
	3	400	0.43	39.06	91.05	23.10	53.85
	6	400	0.43	37.86	88.46	14.39	33.62
	12	400	0.58	39.71	68.58	21.51	37.15
	24	400	0.63	35.46	56.11	20.55	32.52
	72	400	0.78	37.64	48.38	19.80	25.45
	120	400	0.99	36.33	36.85	20.67	20.96
	168	400	0.89	35.74	40.16	24.69	27.74
100	0	400	0.29	28.91	101.44	5.13	18.00
	1	400	0.25	31.79	129.76	12.81	52.29
	3	400	0.24	33.58	141.09	17.77	74.66
	6	400	0.32	28.49	87.93	10.91	33.67
	12	400	0.68	32.25	47.57	10.38	15.31
	24	400	0.55	33.44	61.25	10.29	18.85
	72	400	0.85	32.35	38.15	11.33	13.36
	120	400	1.09	34.53	31.65	9.73	8.92
	168	400	0.63	35.40	56.64	15.03	24.05
300	0	400	0.10	80.75	841.15	30.41	316.77
	1	400	0.17	80.79	486.69	40.55	244.28
	3	400	0.13	80.63	601.72	37.60	280.60
	6	400	0.13	38.52	289.62	0	0
	12	400	0.13	39.62	302.44	0	0
	24	400	0.22	33.79	152.90	0	0

ตารางภาคผนวก ข2 (ต่อ)

NaCl (mM)	Time (h)	Volume (μ l)	Total protein (mg)	ATPase		P-ATPase	
				Total	Specific	Total	Specific
				activity (units)	activity (units/mg)	activity (units)	activity (units/mg)
300	72	400	0.17	40.84	234.71	1.64	9.43
	120	400	0.15	43.02	284.90	6.98	46.23
	168	400	0.17	43.89	255.17	0	0
500	0	400	0.08	82.67	1073.64	18.76	243.64
	1	400	0.19	81.45	424.22	24.09	125.47
	3	400	1.49	83.38	56.11	25.04	16.85
	6	400	0.20	81.75	404.70	26.32	130.30
	12	400	0.11	81.01	750.09	21.92	202.96
	24	400	0.21	80.81	386.65	22.24	106.41
	72	400	0.12	81.14	705.57	21.88	190.26
	120	400	0.15	80.94	536.03	22.69	150.26
	168	400	0.06	80.76	1261.88	25.84	403.75
	0	400	0.24	81.75	335.04	36.57	149.88
600	1	400	0.22	82.19	380.51	28.62	132.50
	3	400	0.27	80.74	299.04	35.89	132.92
	6	400	0.28	80.14	284.18	34.24	121.42
	12	400	0.45	81.09	182.22	33.22	74.65
	24	400	0.65	80.93	124.51	38.57	59.34
	72	400	0.69	81.75	117.97	34.86	50.30
	120	400	0.30	81.10	272.15	33.80	113.42
	168	400	0.26	81.63	315.17	29.23	112.86

ตารางภาคผนวก ข3 ปริมาณ โปรตีนและค่าความจำเพาะของเอนไซม์ glucosidase ในใบ

NaCl (mM)	Time (h)	Volume (μ l)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)
0	0	400	0.45	0.19	0.42
	1	400	0.36	0.13	0.36
	3	400	0.46	0.17	0.37
	6	400	0.51	0.23	0.45
	12	400	0.42	0.18	0.43
	24	400	0.31	0.12	0.39
	72	400	0.46	0.19	0.41
	120	400	0.43	0.18	0.42
	168	400	0.51	0.22	0.43
100	0	400	0.57	0.23	0.40
	1	400	0.43	0.13	0.30
	3	400	0.41	0.12	0.29
	6	400	0.60	0.23	0.38
	12	400	0.38	0.14	0.37
	24	400	0.49	0.24	0.49
	72	400	0.47	0.18	0.38
	120	400	0.46	0.33	0.72
	168	400	0.57	0.36	0.63
300	0	400	0.27	0.18	0.67
	1	400	0.22	0.12	0.55
	3	400	0.16	0.16	1.00
	6	400	0.20	0.17	0.85
	12	400	0.19	0.31	1.63
	24	400	0.23	0.47	2.04

ตารางภาคผนวก ข3 (ต่อ)

NaCl (mM)	Time (h)	Volume (μ l)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)
300	72	400	0.43	0.50	1.16
	120	400	0.29	0.42	1.45
	168	400	0.29	0.49	1.69
500	0	400	0.19	0.14	0.74
	1	400	0.15	0.16	1.07
	3	400	0.33	0.37	1.12
	6	400	0.33	0.27	0.82
	12	400	0.25	0.43	1.72
	24	400	0.25	0.38	1.52
	72	400	0.54	0.62	1.15
	120	400	0.43	0.46	1.07
	168	400	0.33	0.45	1.36
	0	400	1.17	0.20	0.17
600	1	400	1.25	0.15	0.12
	3	400	1.53	0.18	0.12
	6	400	1.65	0.27	0.16
	12	400	1.35	0.30	0.22
	24	400	1.70	0.43	0.25
	72	400	1.39	0.31	0.22
	120	400	1.52	0.45	0.30
	168	400	1.06	0.48	0.45

ตารางภาคผนวก ข4 ปริมาณ โปรตีนและค่าความจำเพาะของเอนไซม์ glucosidase ในราก

NaCl (mM)	Time (h)	Volume (μ l)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)
0	0	400	0.11	0.01	0.09
	1	400	0.19	0.01	0.05
	3	400	0.43	0.03	0.07
	6	400	0.43	0.03	0.07
	12	400	0.58	0.02	0.03
	24	400	0.63	0.03	0.05
	72	400	0.78	0.03	0.04
	120	400	0.99	0.04	0.04
	168	400	0.89	0.04	0.04
100	0	400	0.29	0.03	0.11
	1	400	0.25	0.01	0.04
	3	400	0.24	0.02	0.08
	6	400	0.32	0.03	0.09
	12	400	0.68	0.03	0.04
	24	400	0.55	0.03	0.05
	72	400	0.85	0.03	0.04
	120	400	1.09	0.04	0.04
	168	400	0.63	0.03	0.05
300	0	400	0.10	0.04	0.42
	1	400	0.17	0.02	0.12
	3	400	0.13	0.02	0.15
	6	400	0.13	0.03	0.23
	12	400	0.13	0.02	0.15
	24	400	0.22	0.02	0.09

ตารางภาคผนวก ข4 (ต่อ)

NaCl (mM)	Time (h)	Volume (μ l)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)
300	72	400	0.17	0.02	0.11
	120	400	0.15	0.02	0.13
	168	400	0.17	0.01	0.06
500	0	400	0.08	0.02	0.26
	1	400	0.19	0.03	0.16
	3	400	1.49	0.03	0.02
	6	400	0.20	0.04	0.20
	12	400	0.11	0.02	0.19
	24	400	0.21	0.03	0.14
	72	400	0.12	0.02	0.17
	120	400	0.15	0.02	0.13
	168	400	0.06	0.01	0.16
600	0	400	0.24	0.03	0.12
	1	400	0.22	0.02	0.09
	3	400	0.27	0.02	0.07
	6	400	0.28	0.03	0.11
	12	400	0.45	0.02	0.04
	24	400	0.65	0.02	0.03
	72	400	0.69	0.01	0.01
	120	400	0.30	0.01	0.03
	168	400	0.26	0.01	0.04

ตารางภาคผนวก ข5 ปริมาณโปรตีนและค่าความจำเพาะของเอนไซม์ GST ในใบ

NaCl (mM)	Time (h)	Volume (μ l)	Total protein (μ g)	Total activity (units)	Specific activity (units/ μ g)
0	0	400	445.14	2.11	4.74
	1	400	363.37	1.77	4.87
	3	400	463.78	1.25	2.70
	6	400	506.67	1.65	3.26
	12	400	421.37	0.11	0.26
	24	400	308.92	0.46	1.49
	72	400	456.22	1.20	2.63
	120	400	427.31	0.85	1.99
	168	400	509.08	1.82	3.58
100	0	400	567.55	1.94	3.42
	1	400	430.36	0.68	1.58
	3	400	410.76	1.54	3.75
	6	400	597.43	1.08	1.81
	12	400	380.24	0.74	1.95
	24	400	485.14	0.51	1.05
	72	400	470.20	1.94	4.13
	120	400	460.72	0.74	1.61
	168	400	571.56	2.11	3.69
300	0	400	270.36	2.68	9.91
	1	400	216.87	1.59	7.33
	3	400	160.32	2.62	16.34
	6	400	201.29	2.16	10.73
	12	400	188.27	1.71	9.08
	24	400	226.03	2.51	11.10

ตารางภาคผนวก ข5 (ต่อ)

NaCl (mM)	Time (h)	Volume (μ l)	Total protein (μ g)	Total activity (units)	Specific activity (units/ μ g)
300	72	400	429.40	1.20	2.79
	120	400	292.21	4.04	13.83
	168	400	288.03	7.57	26.28
500	0	400	187.79	1.20	6.39
	1	400	149.56	1.02	6.82
	3	400	333.65	1.42	4.26
	6	400	327.55	0.97	2.96
	12	400	253.33	1.37	5.41
	24	400	249.96	1.48	5.92
	72	400	540.56	1.99	3.68
	120	400	425.54	1.76	4.14
	168	400	333.33	1.37	4.11
600	0	400	1174.46	1.20	1.02
	1	400	1246.91	0.97	0.78
	3	400	1528.35	0.85	0.56
	6	400	1646.42	0.85	0.52
	12	400	1354.05	1.25	0.92
	24	400	1696.87	1.42	0.84
	72	400	1393.09	1.48	1.06
	120	400	1523.05	2.16	1.42
	168	400	1056.54	2.39	2.26

ตารางภาคผนวก ข6 ปริมาณโปรตีนและค่าความจำเพาะของเอนไซม์ GST ในราก

NaCl (mM)	Time (h)	Volume (μ l)	Total protein (μ g)	Total activity (units)	Specific activity (units/ μ g)
0	0	400	110.52	0.80	7.24
	1	400	189.88	1.37	7.22
	3	400	429.07	1.99	4.64
	6	400	428.27	1.31	3.06
	12	400	579.11	1.08	1.86
	24	400	632.29	1.94	3.07
	72	400	777.67	1.20	1.54
	120	400	986.02	1.37	1.39
	168	400	889.96	1.65	1.85
100	0	400	285.14	0.40	1.40
	1	400	245.14	0.80	3.26
	3	400	237.75	0.91	3.83
	6	400	323.54	1.82	5.63
	12	400	678.23	1.37	2.02
	24	400	545.70	2.33	4.27
	72	400	847.71	1.42	1.68
	120	400	1091.25	0.97	0.89
	168	400	625.38	2.73	4.37
300	0	400	96.22	2.11	21.93
	1	400	165.78	1.94	11.70
	3	400	133.65	4.16	31.13
	6	400	133.01	1.20	9.02
	12	400	130.92	1.65	12.60
	24	400	221.20	2.16	9.76

ตารางภาคผนวก ข6 (ต่อ)

NaCl (mM)	Time (h)	Volume (μ l)	Total protein (μ g)	Total activity (units)	Specific activity (units/ μ g)
300	72	400	173.81	0.68	3.91
	120	400	151.32	1.71	11.30
	168	400	171.89	1.20	6.98
500	0	400	76.63	2.22	28.97
	1	400	191.81	1.65	8.60
	3	400	1485.94	1.59	1.07
	6	400	202.09	1.37	6.78
	12	400	107.63	1.54	14.31
	24	400	208.84	0.91	4.36
	72	400	114.70	1.31	11.42
	120	400	150.68	1.14	7.57
	168	400	64.10	1.11	17.32
	0	400	243.69	1.94	7.96
600	1	400	216.06	0.81	3.75
	3	400	270.36	0.98	3.62
	6	400	281.93	0.11	0.39
	12	400	444.82	0.64	1.44
	24	400	649.64	1.56	2.40
	72	400	693.17	1.49	2.15
	120	400	298.47	1.56	5.23
	168	400	259.12	1.84	7.10

ตารางภาคผนวก ข7 ปริมาณ โปรตีนและค่าความจำเพาะของเอนไซม์ acidic peroxidase ในใบ

NaCl (mM)	Time (h)	Volume (μ l)	Total protein (μ g)	Total activity (units)	Specific activity (units/ μ g)
0	0	400	445.14	3.17	7.12
	1	400	363.37	1.67	4.60
	3	400	463.78	6.58	14.19
	6	400	506.67	1.82	3.59
	12	400	421.37	2.68	6.36
	24	400	308.92	0.49	1.59
	72	400	456.22	2.29	5.02
	120	400	427.31	1.13	2.64
	168	400	509.08	4.29	8.43
100	0	400	567.55	5.10	8.99
	1	400	430.36	3.06	7.11
	3	400	410.76	3.04	7.40
	6	400	597.43	3.32	5.56
	12	400	380.24	1.82	4.79
	24	400	485.14	1.41	2.91
	72	400	470.20	4.33	9.21
	120	400	460.72	4.71	10.22
	168	400	571.56	10.50	18.37
300	0	400	270.36	2.23	8.25
	1	400	216.87	1.87	8.62
	3	400	160.32	2.17	13.54
	6	400	201.29	5.77	28.67
	12	400	188.27	2.73	14.50
	24	400	226.03	3.11	13.76

ตารางภาคผนวก ข7 (ต่อ)

NaCl (mM)	Time (h)	Volume (μ l)	Total protein (μ g)	Total activity (units)	Specific activity (units/ μ g)
300	72	400	429.40	3.43	7.99
	120	400	292.21	7.25	24.81
	168	400	288.03	2.62	9.10
500	0	400	187.79	1.05	5.59
	1	400	149.56	1.01	6.75
	3	400	333.65	2.00	5.99
	6	400	327.55	3.22	9.83
	12	400	253.33	2.15	8.49
	24	400	249.96	4.93	19.72
	72	400	540.56	1.65	3.05
	120	400	425.54	8.11	19.06
	168	400	333.33	3.97	11.91
600	0	400	1174.46	2.02	1.72
	1	400	1246.91	1.31	1.05
	3	400	1528.35	4.42	2.89
	6	400	1646.42	2.92	1.77
	12	400	1354.05	2.42	1.79
	24	400	1696.87	7.21	4.25
	72	400	1393.09	2.70	1.94
	120	400	1523.05	6.71	4.41
	168	400	1056.54	1.72	1.63

ตารางภาคผนวก ข8 ปริมาณ โปรตีนและค่าความจำเพาะของเอนไซม์ acidic peroxidase ในราก

NaCl (mM)	Time (h)	Volume (μ l)	Total protein (μ g)	Total activity (units)	Specific activity (units/ μ g)
0	0	400	110.52	0.11	1.00
	1	400	189.88	0.62	3.27
	3	400	429.07	1.01	2.35
	6	400	428.27	3.39	7.92
	12	400	579.11	0.88	1.52
	24	400	632.29	1.35	2.14
	72	400	777.67	1.52	1.95
	120	400	986.02	3.88	3.94
	168	400	889.96	2.40	2.70
100	0	400	285.14	3.39	11.89
	1	400	245.14	0.60	2.45
	3	400	237.75	0.41	1.72
	6	400	323.54	2.34	7.23
	12	400	678.23	1.46	2.15
	24	400	545.70	1.99	3.65
	72	400	847.71	5.47	6.45
	120	400	1091.25	1.93	1.77
	168	400	625.38	1.29	2.06
300	0	400	96.22	0.64	6.65
	1	400	165.78	2.40	14.48
	3	400	133.65	1.07	8.01
	6	400	133.01	0.81	6.09
	12	400	130.92	0.56	4.28
	24	400	221.20	3.19	14.42

ตารางภาคผนวก ข8 (ต่อ)

NaCl (mM)	Time (h)	Volume (μ l)	Total protein (μ g)	Total activity (units)	Specific activity (units/ μ g)
300	72	400	173.81	6.20	35.67
	120	400	151.32	0.34	2.25
	168	400	171.89	0.06	0.35
500	0	400	76.63	0.45	5.87
	1	400	191.81	3.60	18.77
	3	400	1485.94	0.73	0.49
	6	400	202.09	2.92	14.45
	12	400	107.63	2.04	18.95
	24	400	208.84	4.52	21.64
	72	400	114.70	0.62	5.41
	120	400	150.68	0.56	3.72
	168	400	64.10	0.34	5.30
	0	400	243.69	0.96	3.94
600	1	400	216.06	1.69	7.82
	3	400	270.36	1.80	6.66
	6	400	281.93	1.89	6.70
	12	400	444.82	1.24	2.79
	24	400	649.64	1.78	2.74
	72	400	693.17	0.24	0.35
	120	400	298.47	0.88	2.95
	168	400	259.12	2.12	8.18

ตารางภาคผนวก ข9 ปริมาณ โปรตีนและค่าความจำเพาะของเอนไซม์ basic peroxidase ในใบ

NaCl (mM)	Time (h)	Volume (μ l)	Total protein (μ g)	Total activity (units)	Specific activity (units/ μ g)
0	0	400	445.14	0.79	1.77
	1	400	363.37	1.56	4.29
	3	400	463.78	0	0
	6	400	506.67	0	0
	12	400	421.37	0.41	0.97
	24	400	308.92	0.28	0.91
	72	400	456.22	0.15	0.33
	120	400	427.31	0.21	0.49
	168	400	509.08	0.94	1.85
100	0	400	567.55	1.37	2.41
	1	400	430.36	0.66	1.53
	3	400	410.76	0.79	1.92
	6	400	597.43	0.66	1.10
	12	400	380.24	0.41	1.08
	24	400	485.14	0	0
	72	400	470.20	0.21	0.45
	120	400	460.72	0.24	0.52
	168	400	571.56	2.74	4.79
300	0	400	270.36	0.60	2.22
	1	400	216.87	1.03	4.75
	3	400	160.32	1.82	11.35
	6	400	201.29	2.87	14.26
	12	400	188.27	2.12	11.26
	24	400	226.03	0.75	3.32

ตารางภาคผนวก ข9 (ต่อ)

NaCl (mM)	Time (h)	Volume (μ l)	Total protein (μ g)	Total activity (units)	Specific activity (units/ μ g)
300	72	400	429.40	1.09	2.54
	120	400	292.21	0.81	2.77
	168	400	288.03	0.90	3.12
500	0	400	187.79	1.59	8.47
	1	400	149.56	1.26	8.42
	3	400	333.65	1.52	4.56
	6	400	327.55	1.69	5.16
	12	400	253.33	0.81	3.20
	24	400	249.96	2.81	11.24
	72	400	540.56	1.33	2.46
	120	400	425.54	1.26	2.96
	168	400	333.33	1.37	4.11
600	0	400	1174.46	0.56	0.48
	1	400	1246.91	0.21	0.17
	3	400	1528.35	1.31	0.86
	6	400	1646.42	1.05	0.64
	12	400	1354.05	0.71	0.52
	24	400	1696.87	2.29	1.35
	72	400	1393.09	0.58	0.42
	120	400	1523.05	1.35	0.89
	168	400	1056.54	2.89	2.74

ตารางภาคผนวก ข10 ปริมาณโปรตีนและค่าความจำเพาะของเอนไซม์ basidic peroxidase ในราก

NaCl (mM)	Time (h)	Volume (μ l)	Total protein (μ g)	Total activity (units)	Specific activity (units/ μ g)
0	0	400	110.52	0.09	0.81
	1	400	189.88	0	0.00
	3	400	429.07	0.15	0.35
	6	400	428.27	0.21	0.49
	12	400	579.11	0.13	0.22
	24	400	632.29	0.28	0.44
	72	400	777.67	0.26	0.33
	120	400	986.02	0.17	0.17
	168	400	889.96	0.13	0.15
100	0	400	285.14	0.19	0.67
	1	400	245.14	0.09	0.37
	3	400	237.75	0.09	0.38
	6	400	323.54	0.32	0.99
	12	400	678.23	0.13	0.19
	24	400	545.70	0.11	0.20
	72	400	847.71	0.09	0.11
	120	400	1091.25	0.17	0.16
	168	400	625.38	0	0.00
300	0	400	96.22	0.13	1.35
	1	400	165.78	0.24	1.45
	3	400	133.65	0	0.00
	6	400	133.01	0	0.00
	12	400	130.92	0	0.00
	24	400	221.20	0.30	1.36

ตารางภาคผนวก ข10 (ต่อ)

NaCl (mM)	Time (h)	Volume (μ l)	Total protein (μ g)	Total activity (units)	Specific activity (units/ μ g)
300	72	400	173.81	0.36	2.07
	120	400	151.32	0.06	0.40
	168	400	171.89	0	0
500	0	400	76.63	0	0
	1	400	191.81	0.17	0.89
	3	400	1485.94	0	0
	6	400	202.09	0	0
	12	400	107.63	0	0
	24	400	208.84	0	0
	72	400	114.70	0	0
	120	400	150.68	0	0
	168	400	64.10	0	0
600	0	400	243.69	0	0
	1	400	216.06	0.17	0.79
	3	400	270.36	0.17	0.63
	6	400	281.93	0.09	0.32
	12	400	444.82	0	0
	24	400	649.64	0	0
	72	400	693.17	0	0
	120	400	298.47	0	0
	168	400	259.12	0	0

ตารางภาคผนวก ข11 ปริมาณโปรตีนและค่าความจำเพาะของเอนไซม์ neutral peroxidase ในใบ

NaCl (mM)	Time (h)	Volume (μ l)	Total protein (μ g)	Total activity (units)	Specific activity (units/ μ g)
0	0	400	445.14	6.45	14.49
	1	400	363.37	9.33	25.68
	3	400	463.78	10.31	22.23
	6	400	506.67	2.21	4.36
	12	400	421.37	6.50	15.43
	24	400	308.92	0.43	1.39
	72	400	456.22	3.52	7.72
	120	400	427.31	1.37	3.21
	168	400	509.08	7.63	14.99
100	0	400	567.55	12.09	21.30
	1	400	430.36	9.20	21.38
	3	400	410.76	8.53	20.77
	6	400	597.43	9.93	16.62
	12	400	380.24	6.37	16.75
	24	400	485.14	2.08	4.29
	72	400	470.20	6.09	12.95
	120	400	460.72	2.57	5.58
	168	400	571.56	14.60	25.54
300	0	400	270.36	6.24	23.08
	1	400	216.87	7.50	34.58
	3	400	160.32	11.02	68.74
	6	400	201.29	14.32	71.14
	12	400	188.27	12.24	65.01
	24	400	226.03	10.03	44.37

ตารางภาคผนวก ข11 (ต่อ)

NaCl (mM)	Time (h)	Volume (μ l)	Total protein (μ g)	Total activity (units)	Specific activity (units/ μ g)
300	72	400	429.40	11.32	26.36
	120	400	292.21	13.57	46.44
	168	400	288.03	4.95	17.19
500	0	400	187.79	9.41	50.11
	1	400	149.56	9.99	66.80
	3	400	333.65	13.76	41.24
	6	400	327.55	13.36	40.79
	12	400	253.33	9.20	36.32
	24	400	249.96	16.66	66.65
	72	400	540.56	2.08	3.85
	120	400	425.54	18.48	43.43
	168	400	333.33	11.25	33.75
	0	400	1174.46	4.63	3.94
600	1	400	1246.91	1.65	1.32
	3	400	1528.35	11.58	7.58
	6	400	1646.42	9.39	5.70
	12	400	1354.05	7.67	5.66
	24	400	1696.87	17.73	10.45
	72	400	1393.09	3.24	2.33
	120	400	1523.05	13.63	8.95
	168	400	1056.54	2.34	2.21

ตารางภาคผนวก ข12 ปริมาณโปรตีนและค่าความจำเพาะของเอนไซม์ neutral peroxidase ในราก

NaCl (mM)	Time (h)	Volume (μ l)	Total protein (μ g)	Total activity (units)	Specific activity (units/ μ g)
0	0	400	110.52	0.34	3.08
	1	400	189.88	0.64	3.37
	3	400	429.07	2.14	4.99
	6	400	428.27	5.32	12.42
	12	400	579.11	1.80	3.11
	24	400	632.29	2.62	4.14
	72	400	777.67	3.11	4.00
	120	400	986.02	6.54	6.63
	168	400	889.96	6.00	6.74
100	0	400	285.14	5.17	18.13
	1	400	245.14	0.69	2.81
	3	400	237.75	0.79	3.32
	6	400	323.54	4.35	13.45
	12	400	678.23	3.24	4.78
	24	400	545.70	1.22	2.24
	72	400	847.71	2.38	2.81
	120	400	1091.25	2.89	2.65
	168	400	625.38	1.67	2.67
300	0	400	96.22	1.11	11.54
	1	400	165.78	3.94	23.77
	3	400	133.65	2.21	16.54
	6	400	133.01	1.67	12.56
	12	400	130.92	1.11	8.48
	24	400	221.20	4.39	19.85

ตารางภาคผนวก ข12 (ต่อ)

NaCl (mM)	Time (h)	Volume (μ l)	Total protein (μ g)	Total activity (units)	Specific activity (units/ μ g)
300	72	400	7.02	7.02	7.02
	120	400	13.61	13.61	13.61
	168	400	2.50	2.50	2.50
500	0	400	9.00	9.00	9.00
	1	400	26.38	26.38	26.38
	3	400	1.06	1.06	1.06
	6	400	16.77	16.77	16.77
	12	400	43.20	43.20	43.20
	24	400	14.46	14.46	14.46
	72	400	10.46	10.46	10.46
	120	400	5.71	5.71	5.71
	168	400	11.39	11.39	11.39
600	0	400	11.16	11.16	11.16
	1	400	17.17	17.17	17.17
	3	400	16.16	16.16	16.16
	6	400	19.33	19.33	19.33
	12	400	6.02	6.02	6.02
	24	400	5.42	5.42	5.42
	72	400	1.27	1.27	1.27
	120	400	0.44	0.44	0.44
	168	400	2.16	2.16	2.16

2. การวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟตโดยใช้ KH_2PO_4 เป็นสารละลายมาตรฐาน

2.1 สารเคมี

2.1.1 เตรียม Stock solution ของ 1 M KH_2PO_4 โดยชั่งสารละลาย KH_2PO_4 ด้วยเครื่องชั่งสารอย่างละเอียด 13.6090 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้สารละลายมาตรฐานที่มีปริมาณ KH_2PO_4 ตั้งแต่ 1 – 10 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร

2.1.2 การเตรียมสารละลายสำหรับหาปริมาณฟอสเฟต (ชุดที่ 1)

3 mM ATP	82.7 มิลลิกรัม
0.2 mM ammonium molybdate	12.0 มิลลิกรัม
5 mM magnesium sulfate	62.0 มิลลิกรัม
ละลายสารเคมีในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรด้วย 50 mM Tris-HCl buffer (pH 6.5) ให้ครบ 50 มิลลิลิตร	

2.1.3 การเตรียมสารละลายสำหรับหาปริมาณฟอสเฟต (ชุดที่ 2)

3 mM ATP	82.7 มิลลิกรัม
0.2 mM ammonium molybdate	12.0 มิลลิกรัม
5 mM magnesium sulfate	62.0 มิลลิกรัม
100 mM potassium nitrate	50.6 มิลลิกรัม
ละลายสารเคมีในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรด้วย 50 mM Tris-HCl buffer (pH 6.5) ให้ครบ 50 มิลลิลิตร	

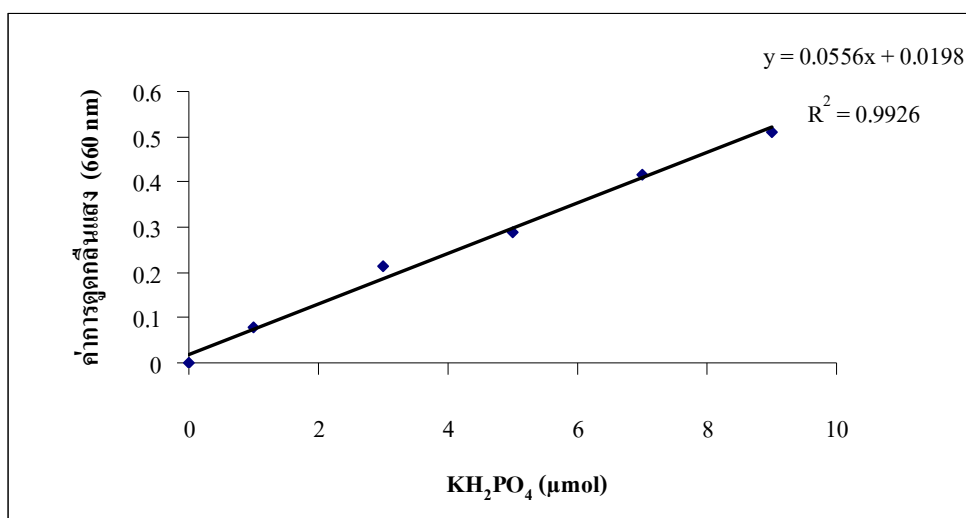
2.1.4 การเตรียม color reagent

8.5 mM ammonium molybdate	2.10	กรัม
1.62 mM malachite green	0.15	กรัม
200 mM perchloric acid	4.40	มิลลิลิตร
0.06 % tween 20	0.12	มิลลิลิตร
ละลายสารเคมีในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนครบ 200 มิลลิลิตร		
สารละลายที่ได้จะตกตะกอนจึงต้องกรองและควรใช้ทันที		
ไม่ควรเก็บไว้นานเกิน 3 สัปดาห์		

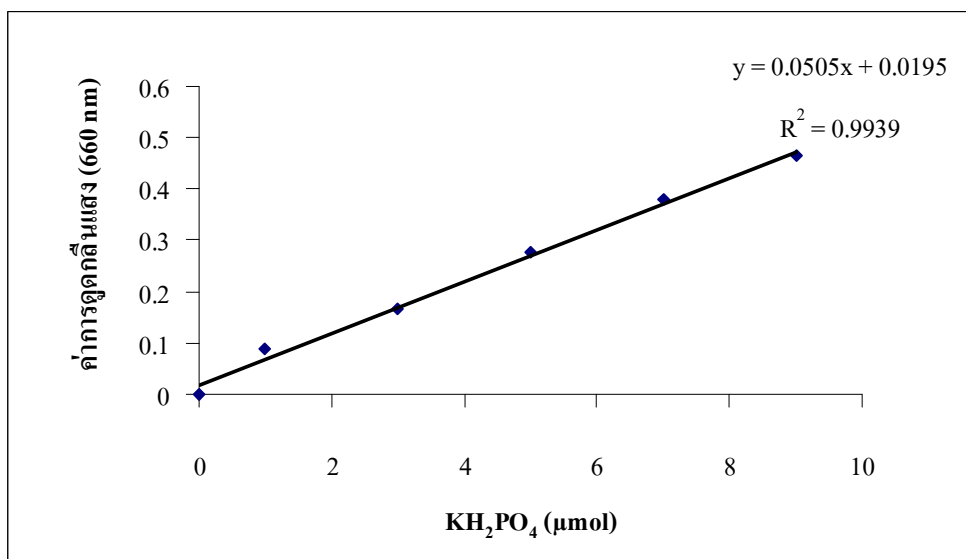
2.2 วิธีการวิเคราะห์

2.2.1 สร้างกราฟมาตรฐานของ KH_2PO_4 โดยเจือจางสารละลายมาตรฐาน KH_2PO_4 ให้มีความเข้มข้น 1, 2, 3, 5, 7.5 และ 10 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน โดยให้แกน X เป็นไมโครโมลของ KH_2PO_4 ส่วนแกน Y เป็นค่าการดูดกลืนแสง

2.2.2 นำสารละลายตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารชุดที่ 1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม color reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยใช้ 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 ซึ่งทำปฏิกิริยากับสารเคมีต่างๆ พร้อมกับสารตัวอย่างเป็นสารละลายเปล่า (blank) แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับหาความเข้มข้นของฟอสเฟตจากกราฟมาตรฐาน และคำนวณหาปริมาณฟอสเฟตที่มีในตัวอย่าง



ภาพผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐานของสารละลาย KH_2PO_4 ชุดที่ 1



ภาพผนวกที่ ข3 กราฟมาตรฐานของสารละลาย KH_2PO_4 ชุดที่ 2

3. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลโดยใช้ฟรุคโตส แมนนิทอล กลูโคสและซูโครสเป็นสารละลายมาตรฐาน

3.1 สารเคมี

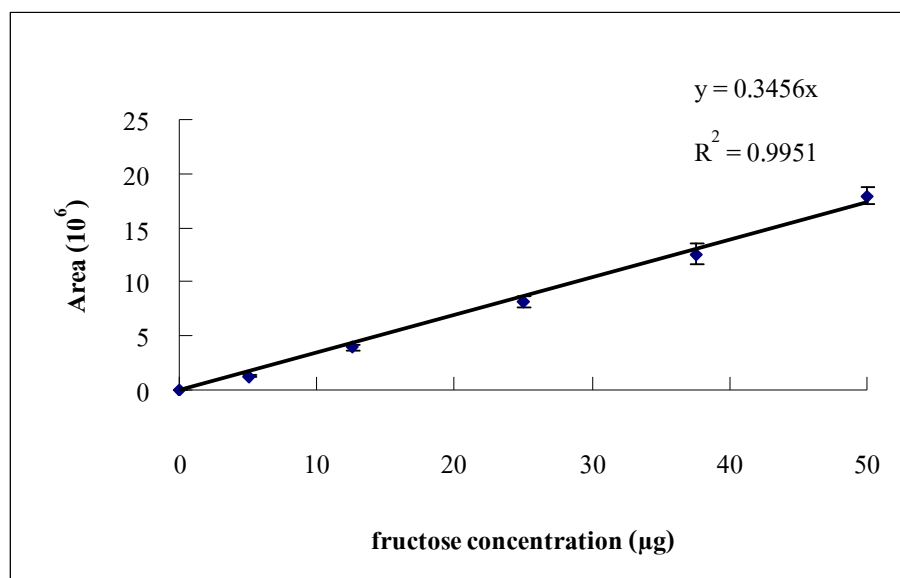
3.1.1 ชั่งสารละลายน้ำตาลแต่ละชนิด คือฟรุคโตส แมนนิทอล กลูโคสและซูโครส ด้วยเครื่องชั่งสารอย่างละเอียด 0.1250 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร สำหรับใช้เป็น stock solution จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้สารละลายมาตรฐานที่มีปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดตั้งแต่ 5 – 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรและกรองผ่าน เมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร

3.1.2 การเตรียมส่วนที่เคลื่อนที่ ใช้อัตราส่วน acetonitrile: nano pure water เท่ากับ 85: 15 ผสมให้เข้ากันและนำไปกรองก่อนใช้

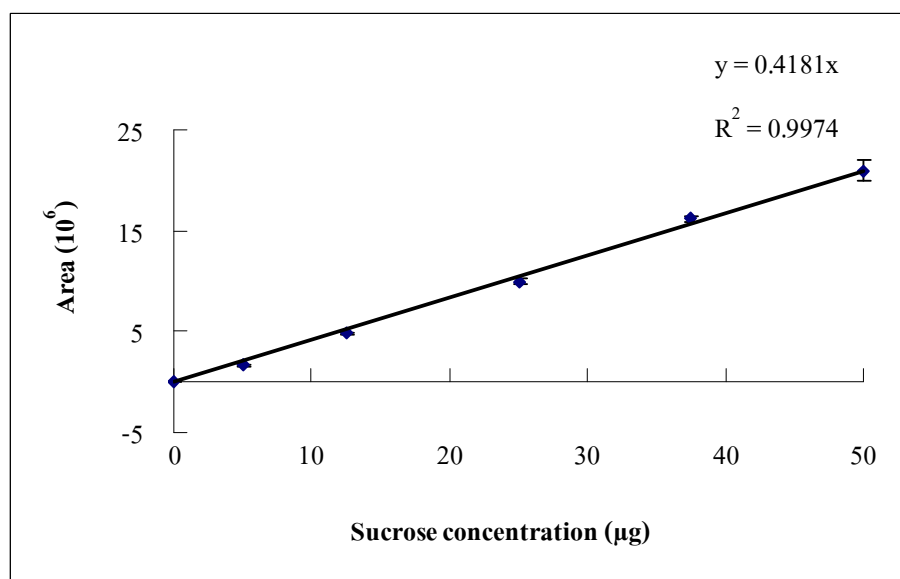
3.2 วิธีการวิเคราะห์

3.2.1 สร้างกราฟมาตรฐานของน้ำตาลโดยเจือจางสารละลายมาตรฐานของ คือฟรุคโตส แมนนิทอล กลูโคส และซูโครสให้มีความเข้มข้น 5, 12.5, 25, 37.5 และ 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร นำค่าพื้นที่ใต้กราฟมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน โดยให้แกน X เป็นมิลลิกรัมน้ำตาล ส่วนแกน Y เป็นค่าพื้นที่ใต้กราฟ

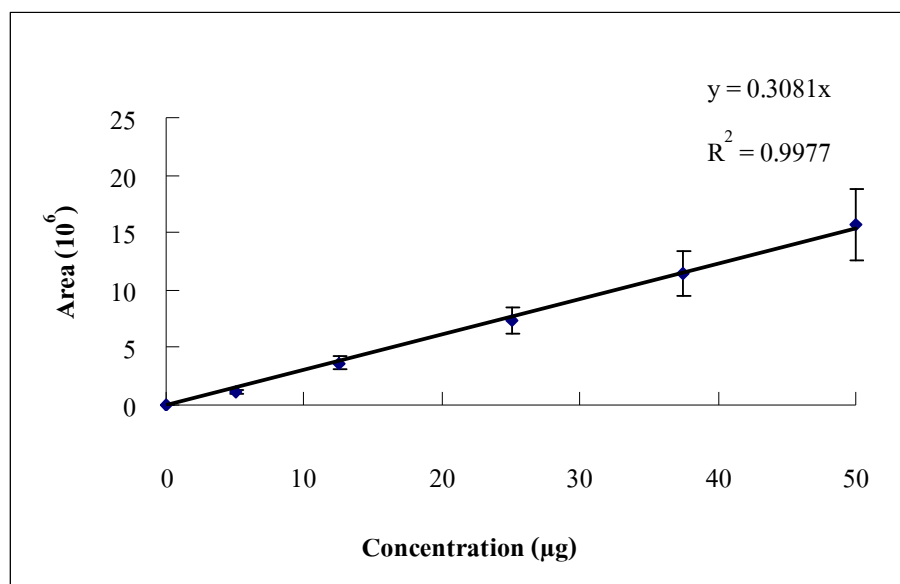
3.2.2 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาลด้วยเทคนิค HPLC โดยฉีดสารละลายตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร เข้าสู่เครื่อง HPLC ที่ใช้คอลัมน์ Hypersil APS-2 และ 85 % acetonitrile เป็นส่วนที่เคลื่อนที่ มีอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งจะอ่านค่าความเหลื่อมแสงโดยใช้ Refractive index detector นำค่าพื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของน้ำตาลแต่ละชนิด จากกราฟมาตรฐาน และคำนวณหาปริมาณน้ำตาลที่มีในตัวอย่าง นำค่า retention time มาหาชนิดของน้ำตาล โดยค่า retention time ของฟรุคโตส แมนนิทอลกับกลูโคส และซูโครสมีค่า 20.4, 23.4 และ 33.1 นาที ตามลำดับ



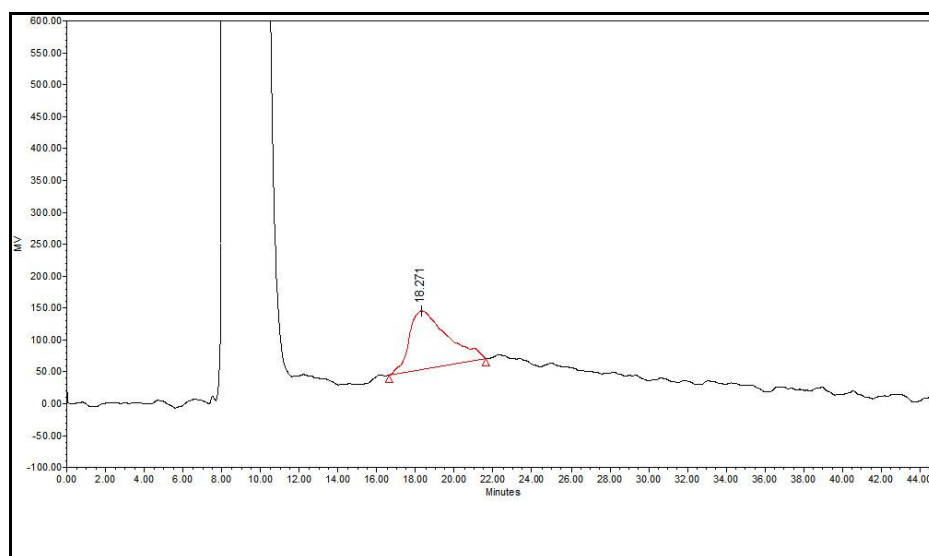
ภาพผนวกที่ ข4 กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลฟรุคโตส



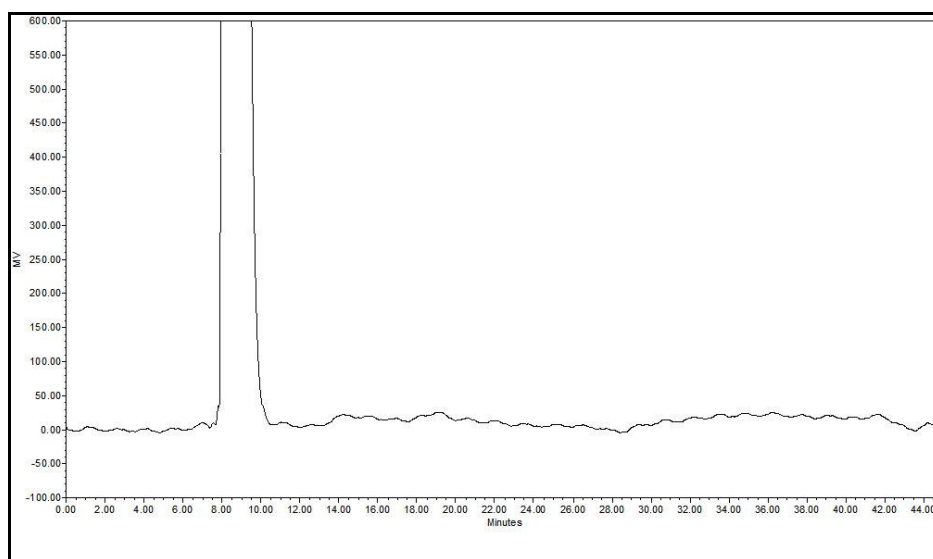
ภาพผนวกที่ ข5 กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลซูโครส



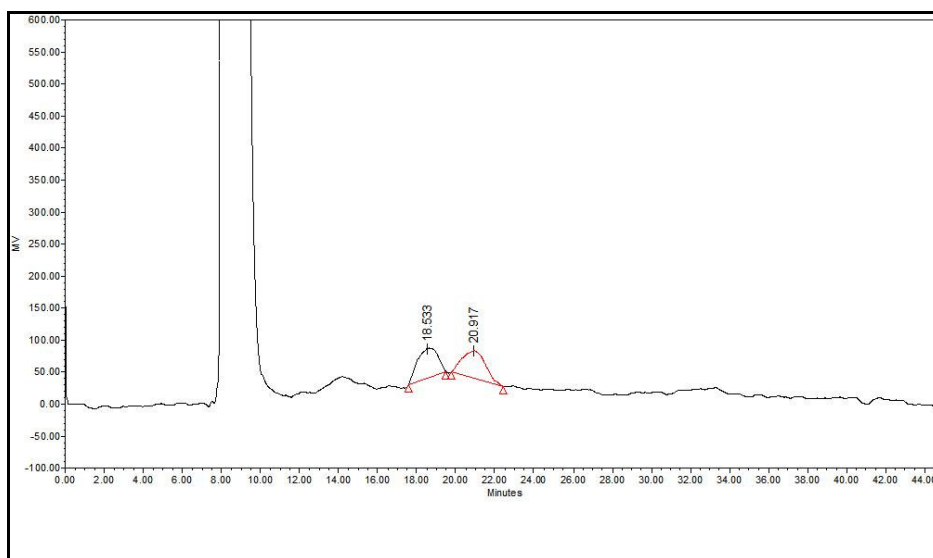
ภาพผนวกที่ ๖ กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลแมนนิทอลและกลูโคส



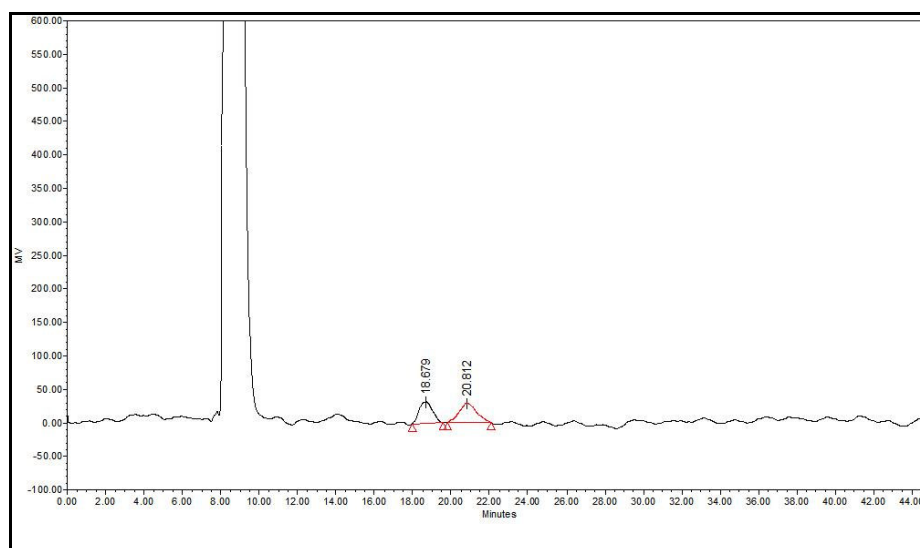
ภาพผนวกที่ ๗ โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนชุดควบคุม (0 mM NaCl) ที่เวลา 0 ชั่วโมง



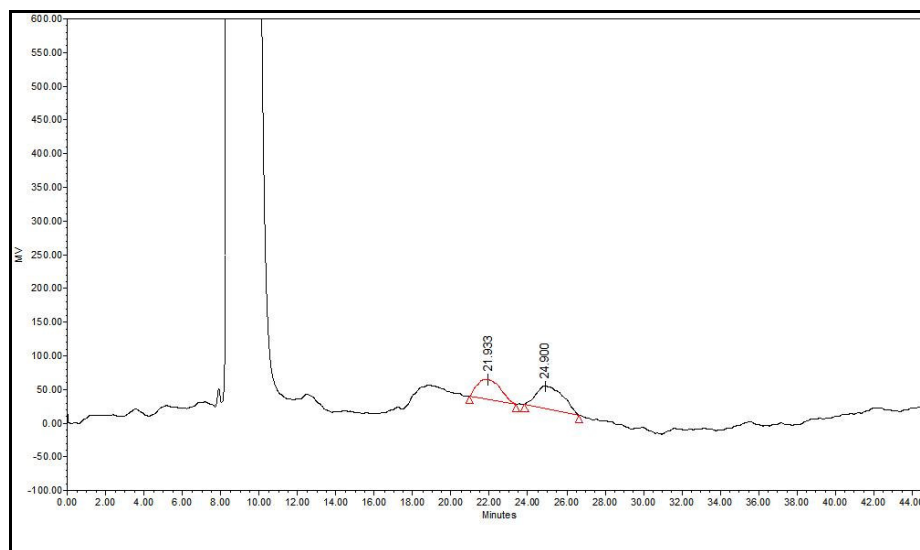
ภาพผนวกที่ ข8 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนชุดควบคุม (0 mM NaCl) ที่เวลา 1 ชั่วโมง



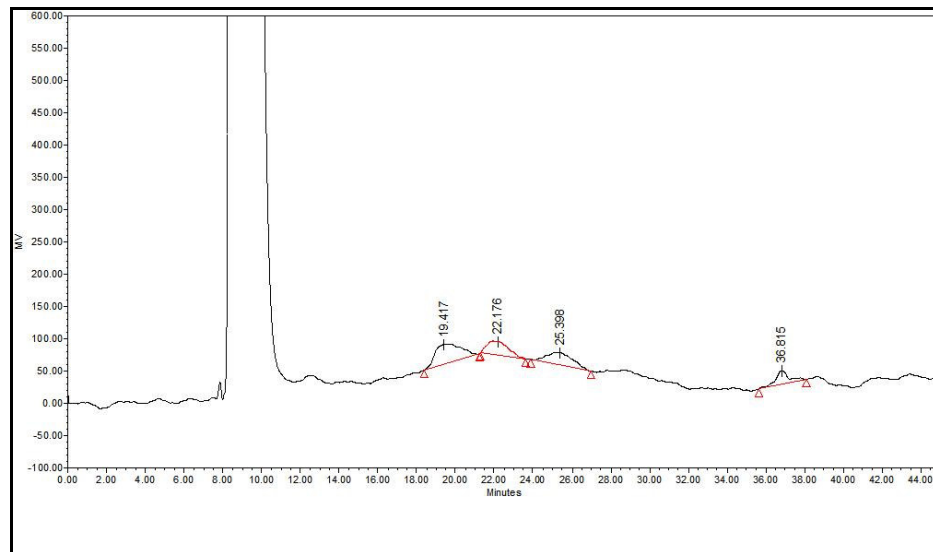
ภาพผนวกที่ ข9 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนชุดควบคุม (0 mM NaCl) ที่เวลา 3 ชั่วโมง



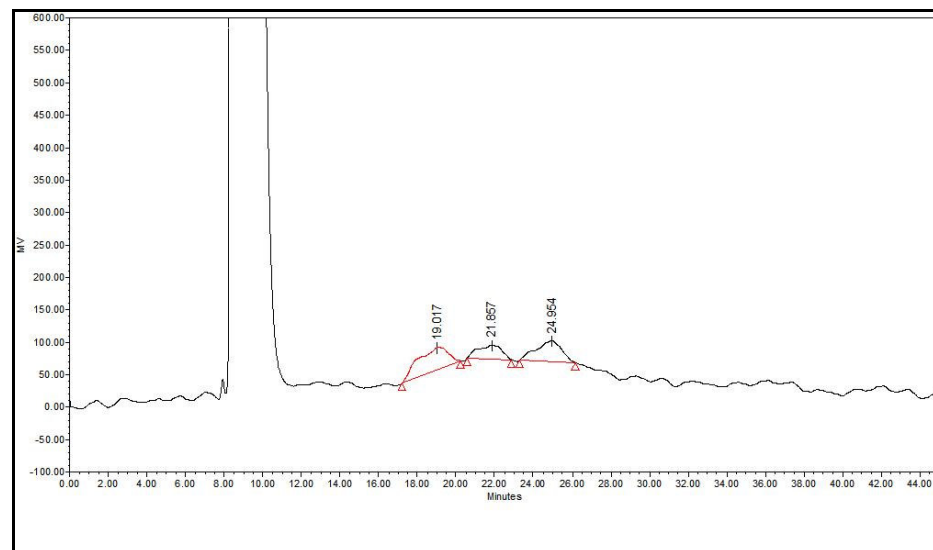
ภาพผนวกที่ ข10 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนชุดควบคุม (0 mM NaCl) ที่เวลา 6 ชั่วโมง



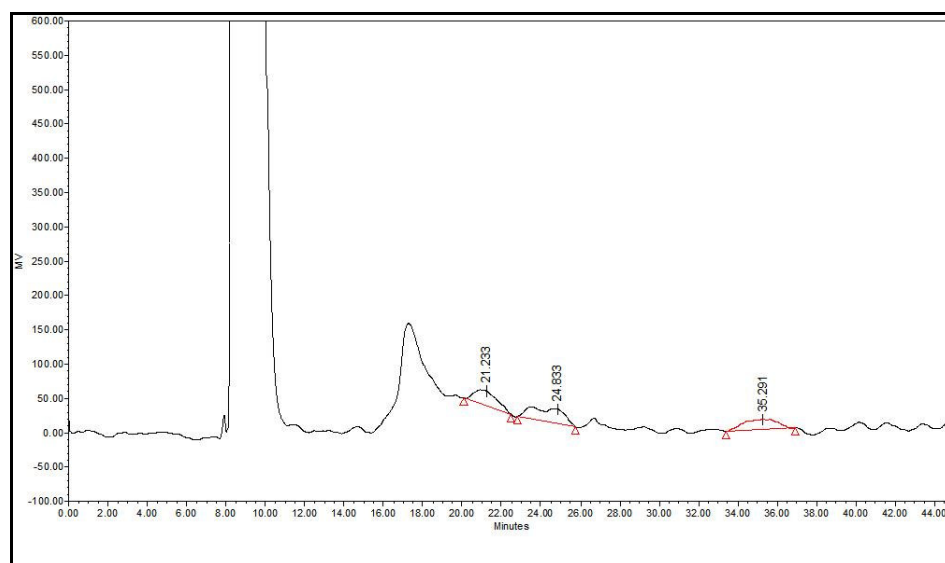
ภาพผนวกที่ ข11 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนชุดควบคุม (0 mM NaCl) ที่เวลา 12 ชั่วโมง



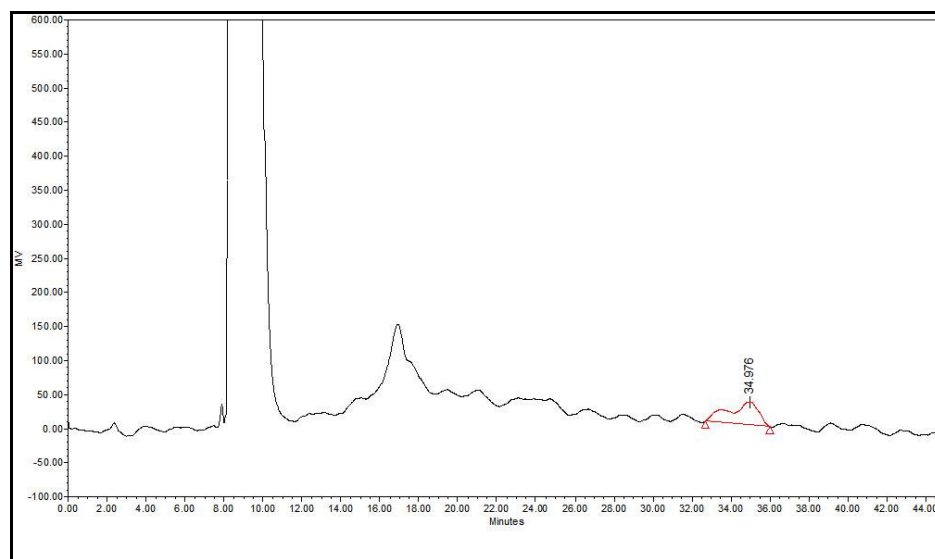
ภาพผนวกที่ ข12 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนชุดควบคุม (0 mM NaCl) ที่เวลา 24 ชั่วโมง



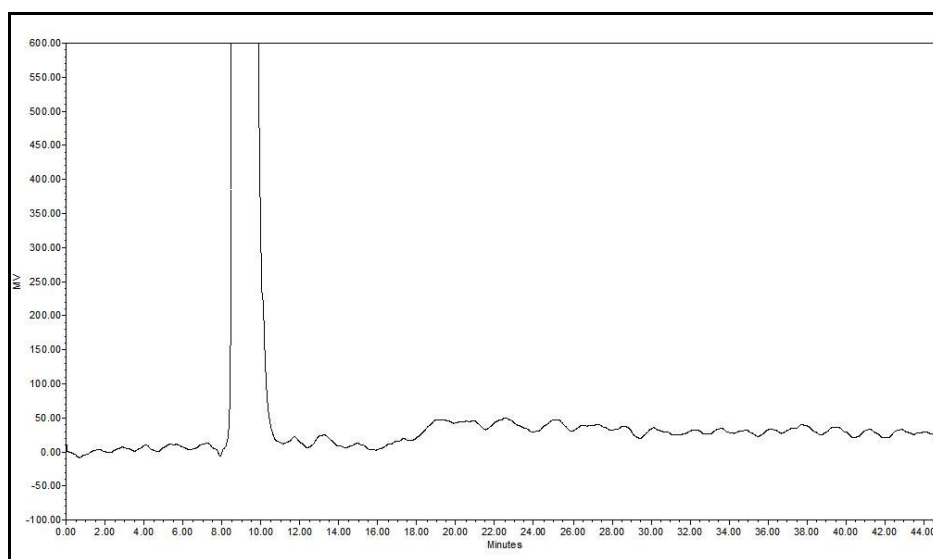
ภาพผนวกที่ ข13 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนชุดควบคุม (0 mM NaCl) ที่เวลา 3 วัน



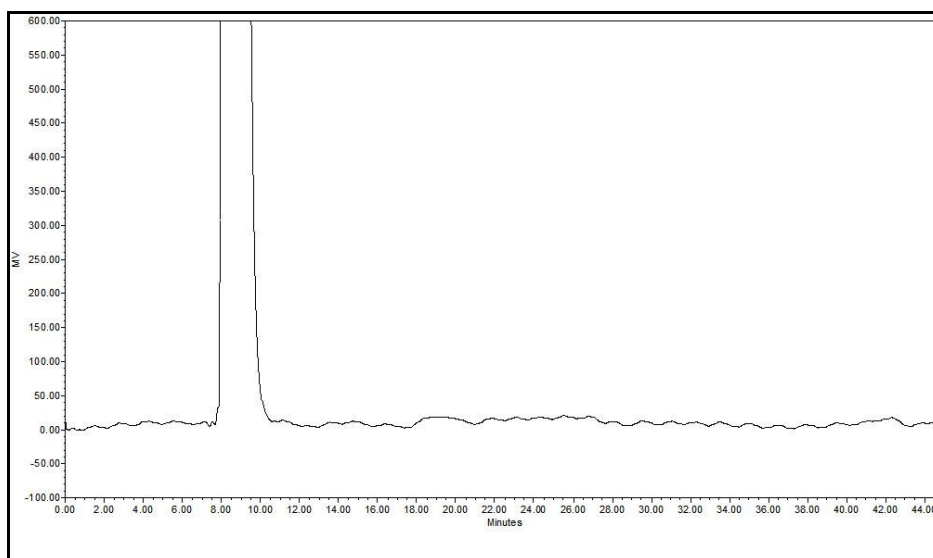
ภาพผนวกที่ ข14 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนชุดควบคุม (0 mM NaCl) ที่เวลา 5 วัน



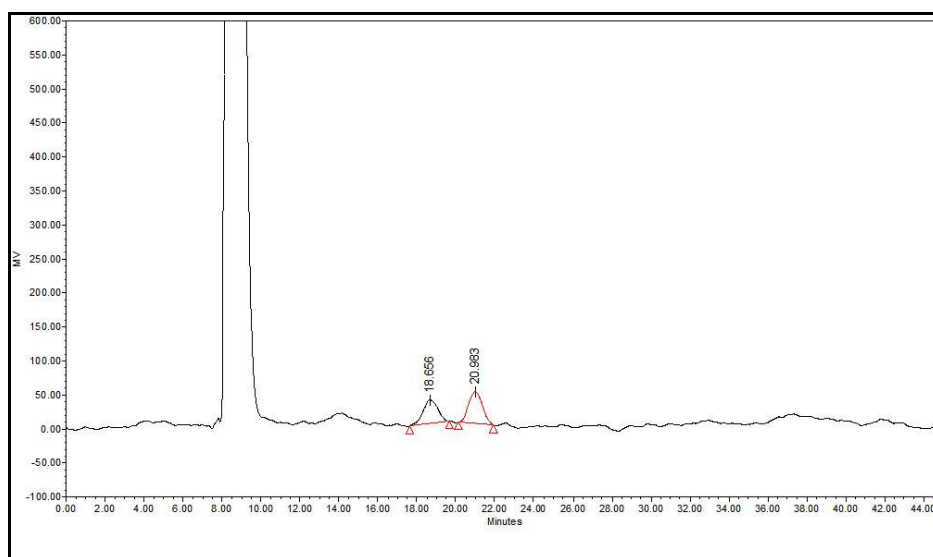
ภาพผนวกที่ ข15 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนชุดควบคุม (0 mM NaCl) ที่เวลา 7 วัน



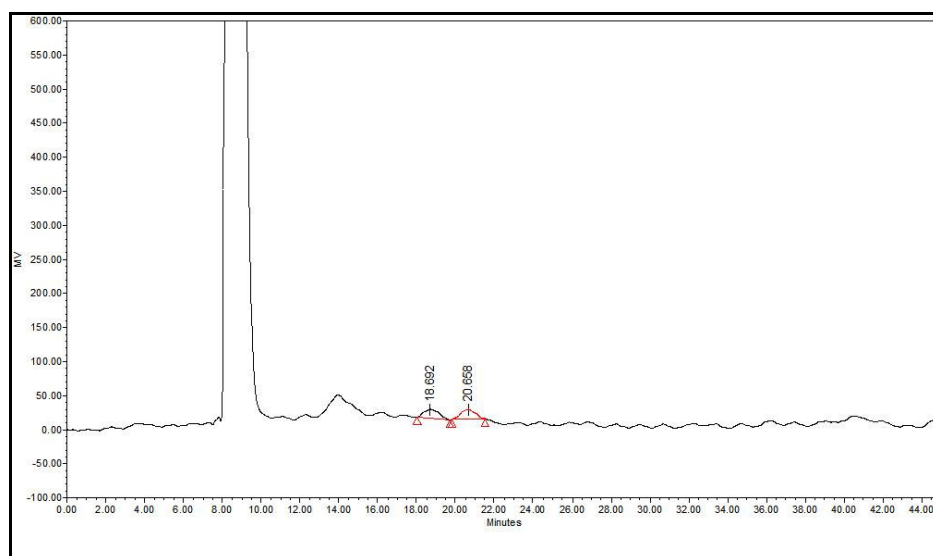
ภาพผนวกที่ ข16 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 100 mM ที่เวลา 0 ชั่วโมง



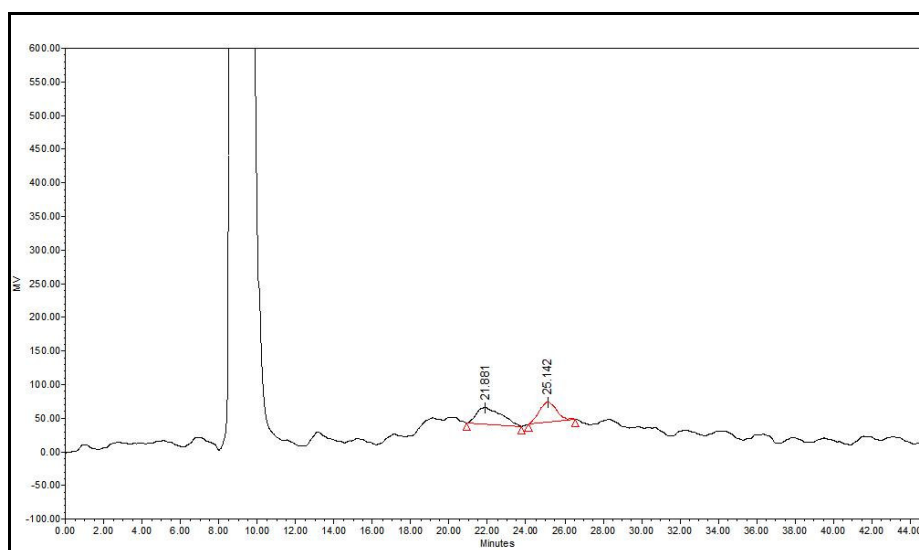
ภาพผนวกที่ ข17 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 100 mM ที่เวลา 1 ชั่วโมง



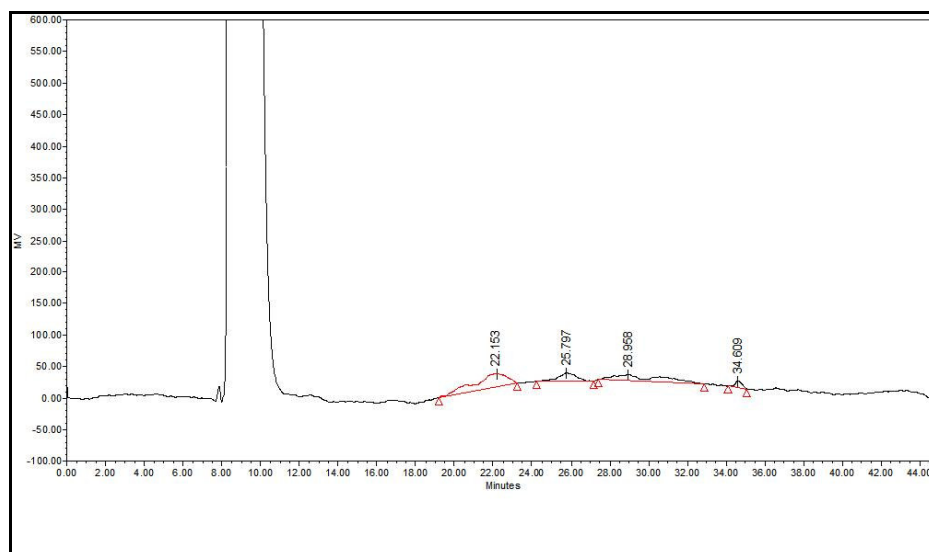
ภาพผนวกที่ ข18 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 100 mM ที่เวลา 3 ชั่วโมง



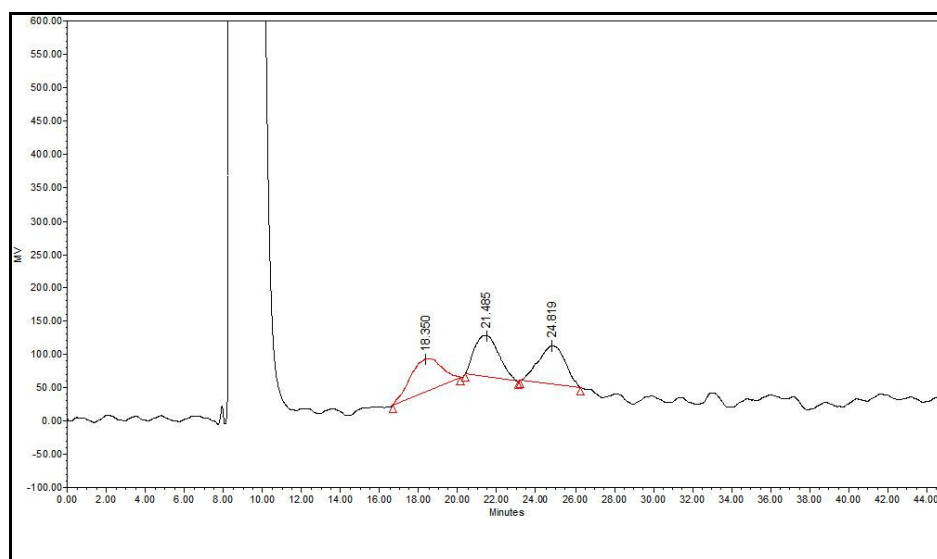
ภาพผนวกที่ ข19 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 100 mM ที่เวลา 6 ชั่วโมง



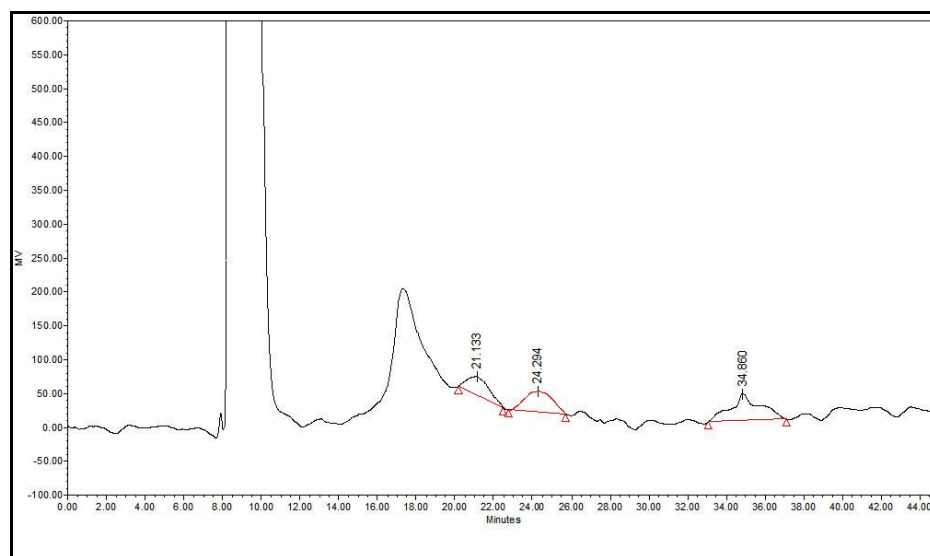
ภาพผนวกที่ ข20 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 100 mM ที่เวลา 12 ชั่วโมง



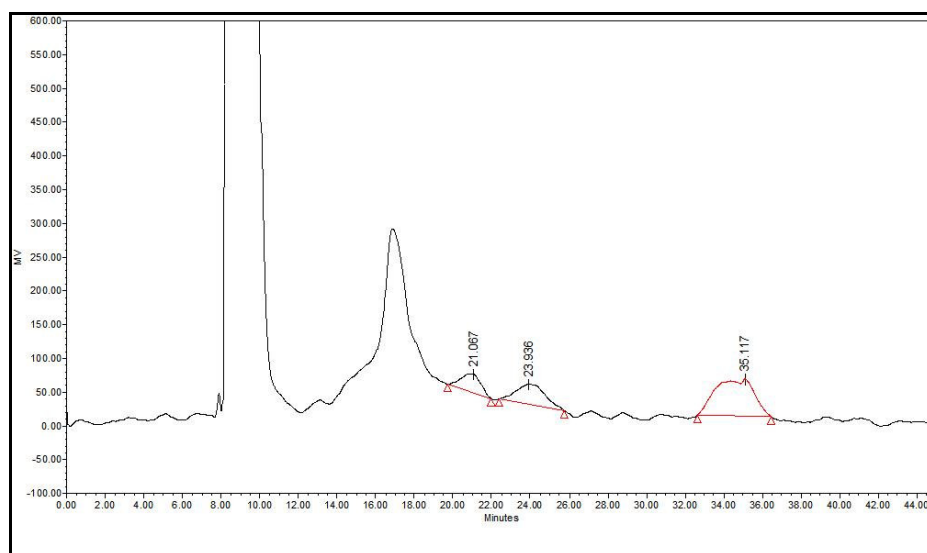
ภาพผนวกที่ ข21 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 100 mM ที่เวลา 24 ชั่วโมง



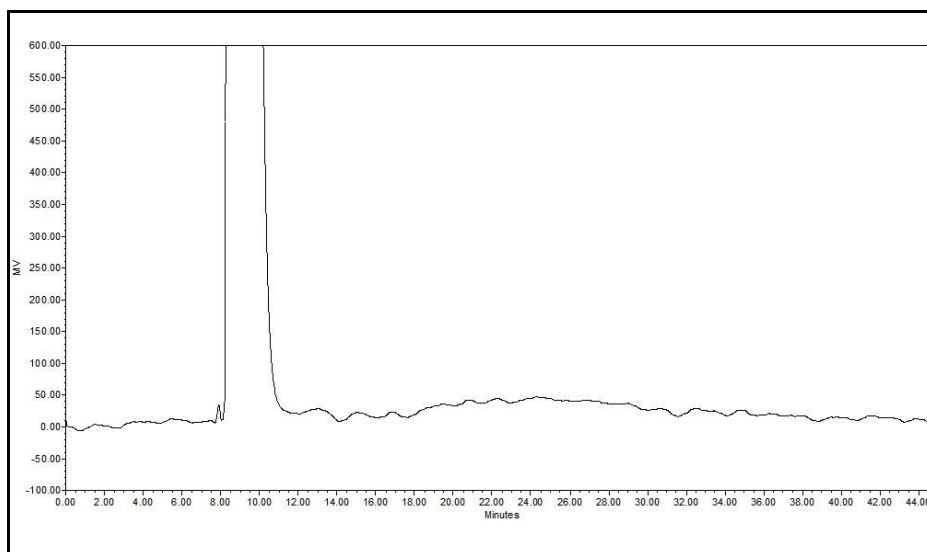
ภาพผนวกที่ ข22 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 100 mM ที่เวลา 3 วัน



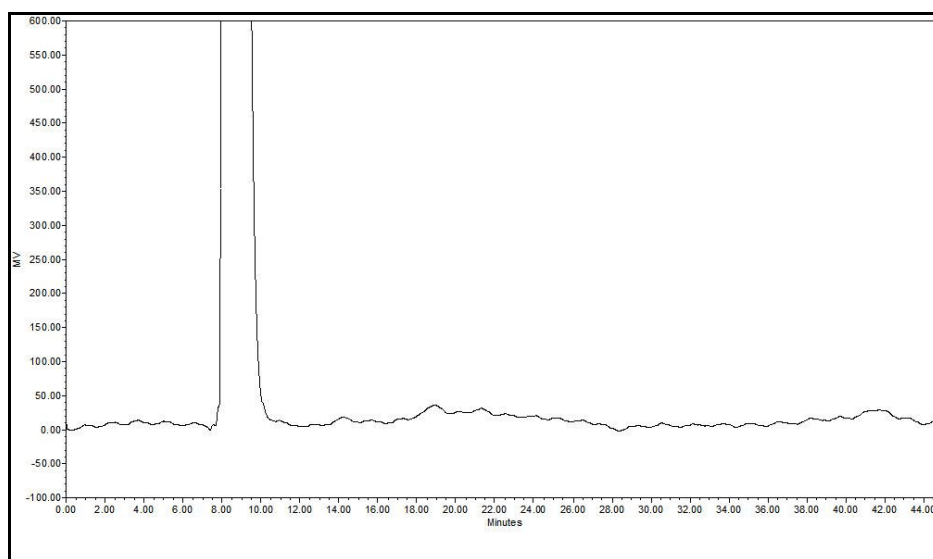
ภาพผนวกที่ ข23 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 100 mM ที่เวลา 5 วัน



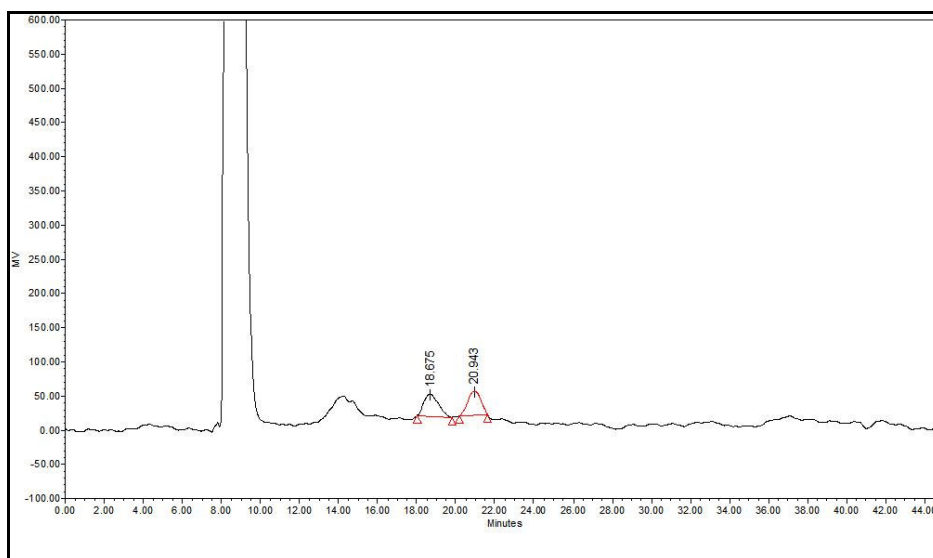
ภาพผนวกที่ ข24 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 100 mM ที่เวลา 7 วัน



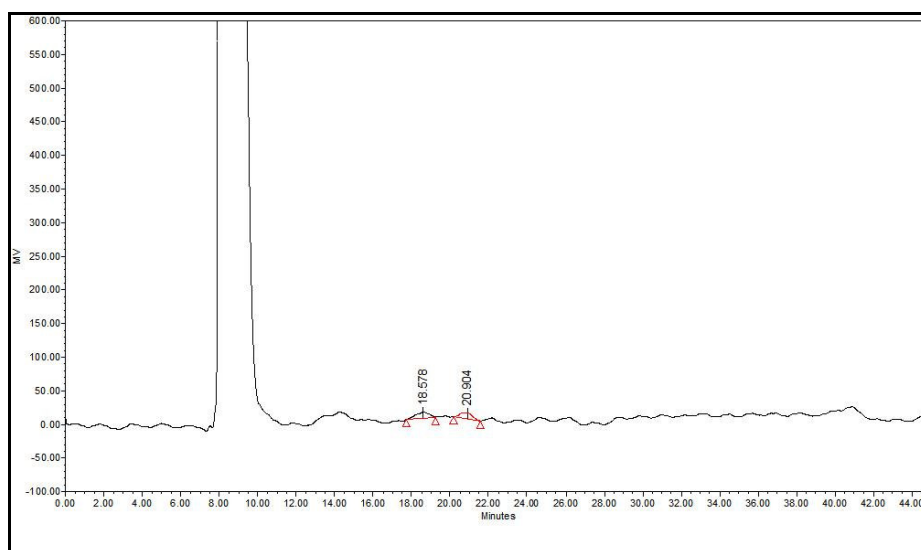
ภาพผนวกที่ ข25 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 300 mM ที่เวลา 0 ชั่วโมง



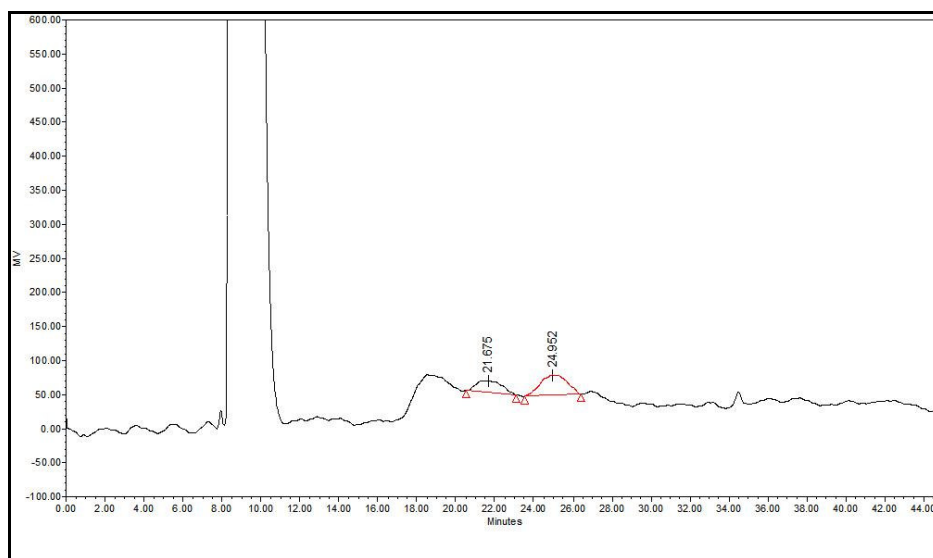
ภาพผนวกที่ ข26 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 300 mM ที่เวลา 1 ชั่วโมง



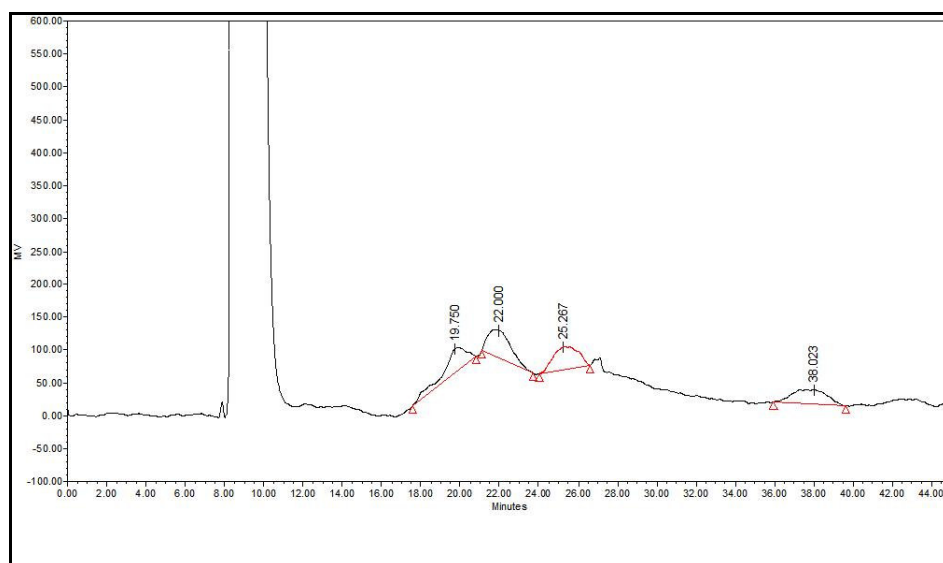
ภาพผนวกที่ ข27 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 300 mM ที่เวลา 3 ชั่วโมง



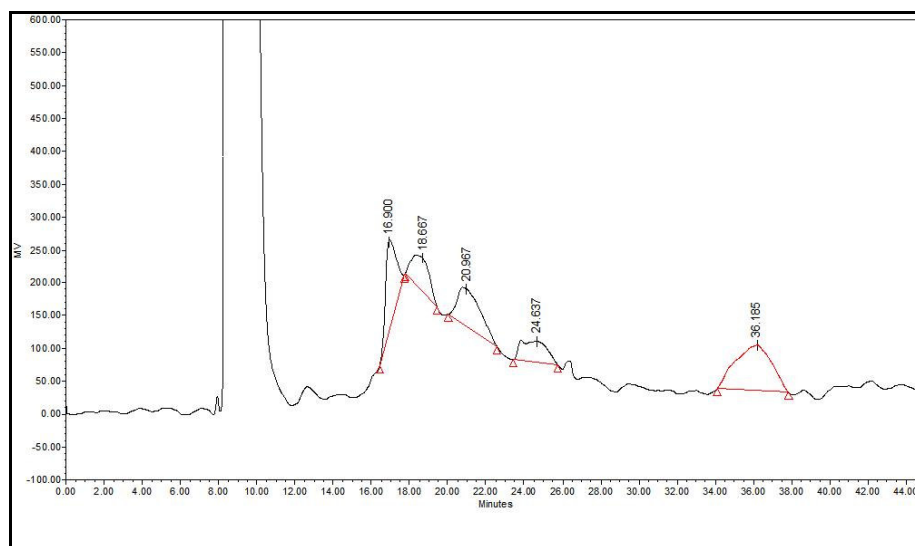
ภาพผนวกที่ ข28 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 300 mM ที่เวลา 6 ชั่วโมง



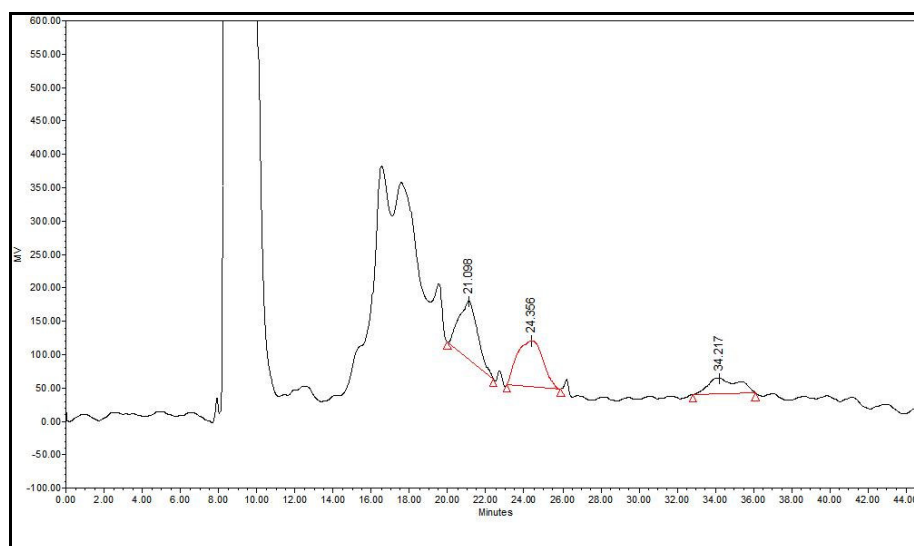
ภาพผนวกที่ ข29 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 300 mM ที่เวลา 12 ชั่วโมง



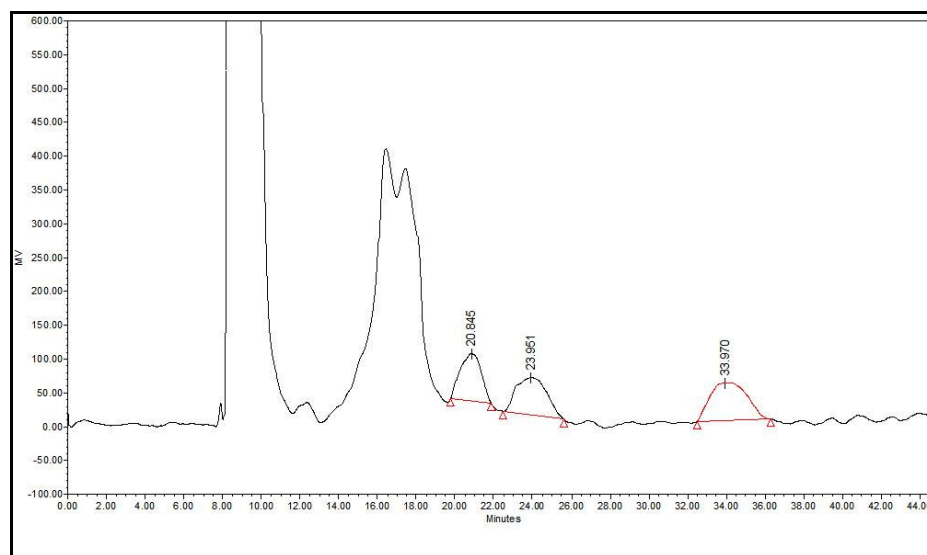
ภาพผนวกที่ ข30 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 300 mM ที่เวลา 24 ชั่วโมง



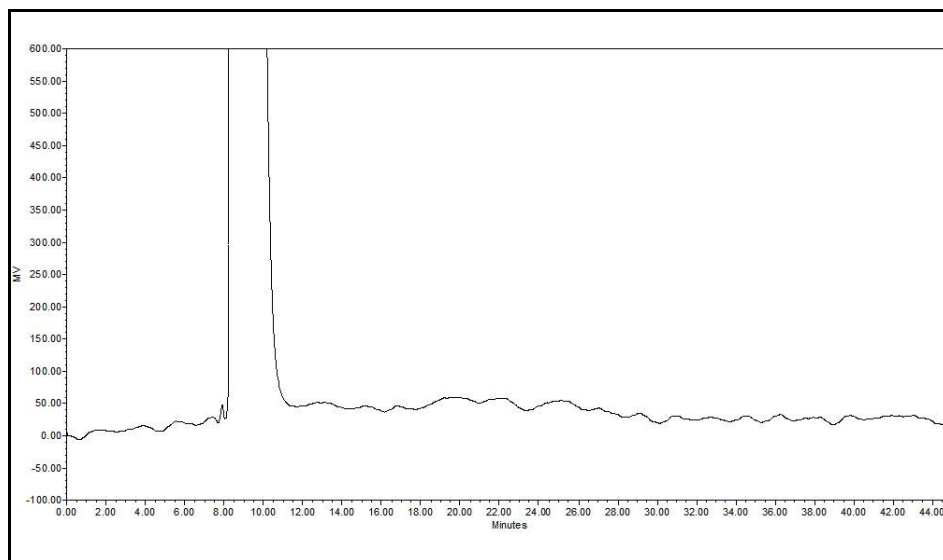
ภาพผนวกที่ ข31 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 300 mM ที่เวลา 3 วัน



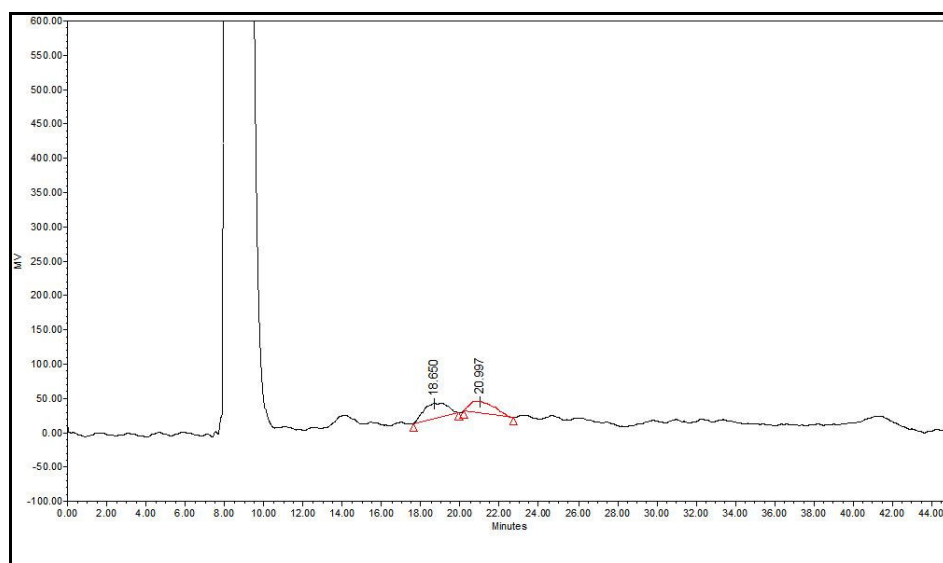
ภาพผนวกที่ ข32 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 300 mM ที่เวลา 5 วัน



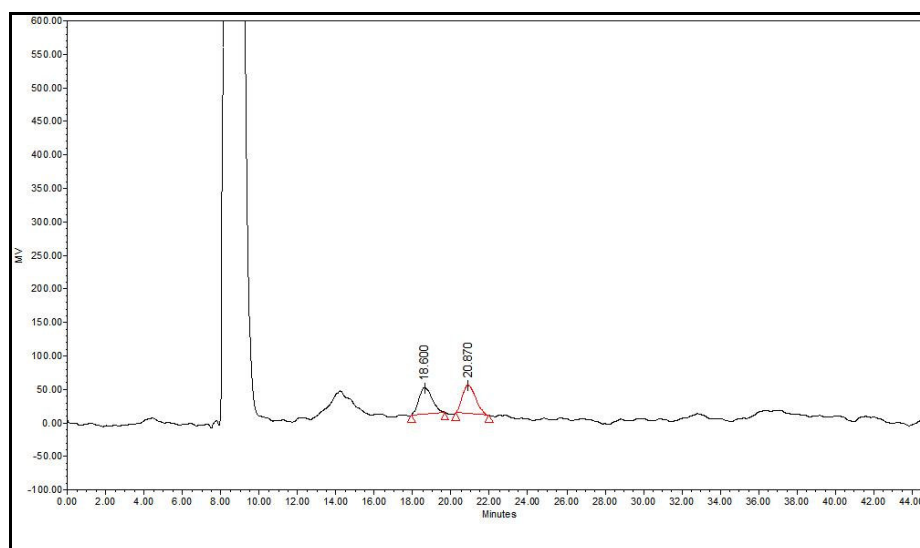
ภาพผนวกที่ ข33 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 300 mM ที่เวลา 7 วัน



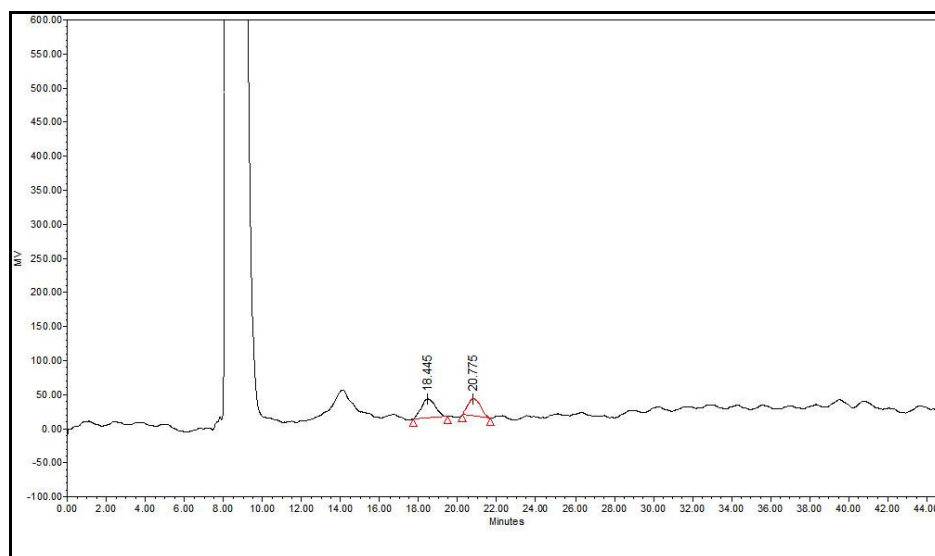
ภาพผนวกที่ ข34 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 500 mM ที่เวลา 0 ชั่วโมง



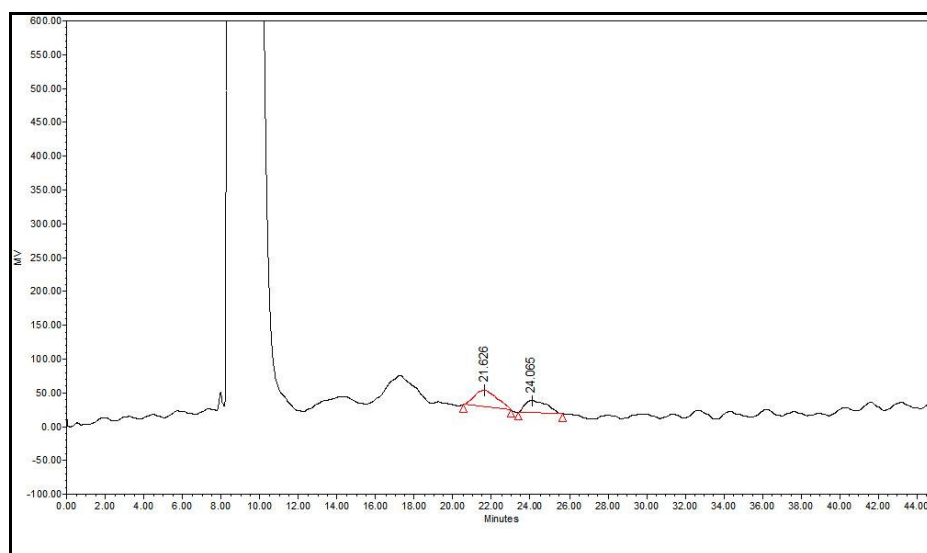
ภาพผนวกที่ ข35 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 500 mM ที่เวลา 1 ชั่วโมง



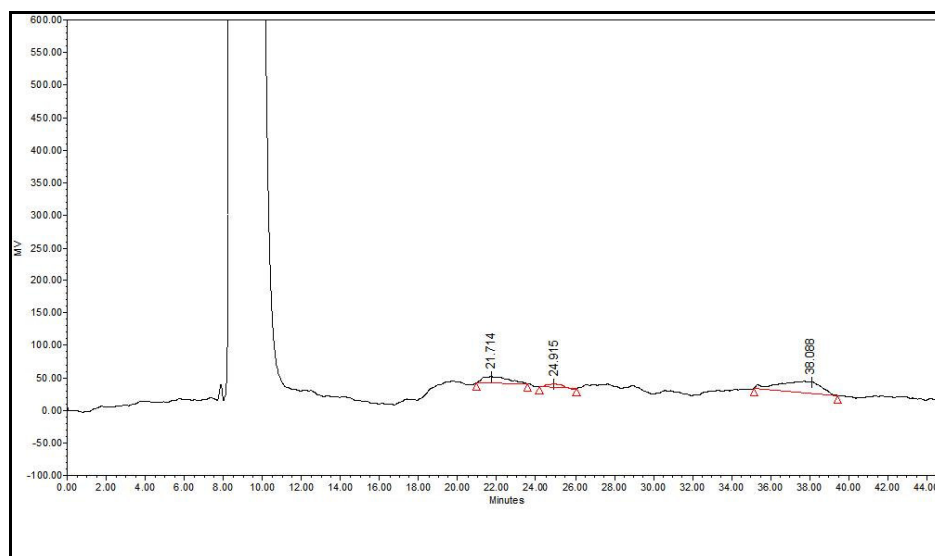
ภาพผนวกที่ ข36 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 500 mM ที่เวลา 3 ชั่วโมง



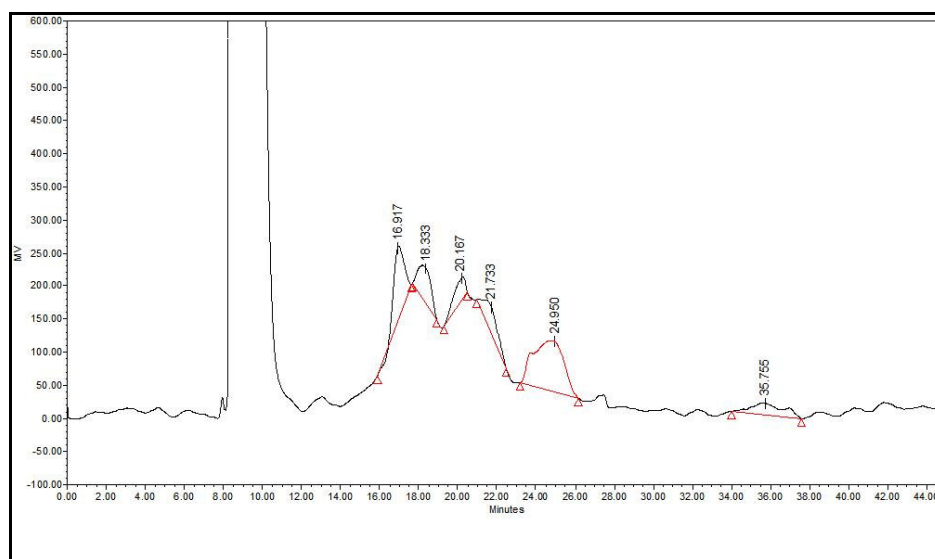
ภาพผนวกที่ ข37 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 500 mM ที่เวลา 6 ชั่วโมง



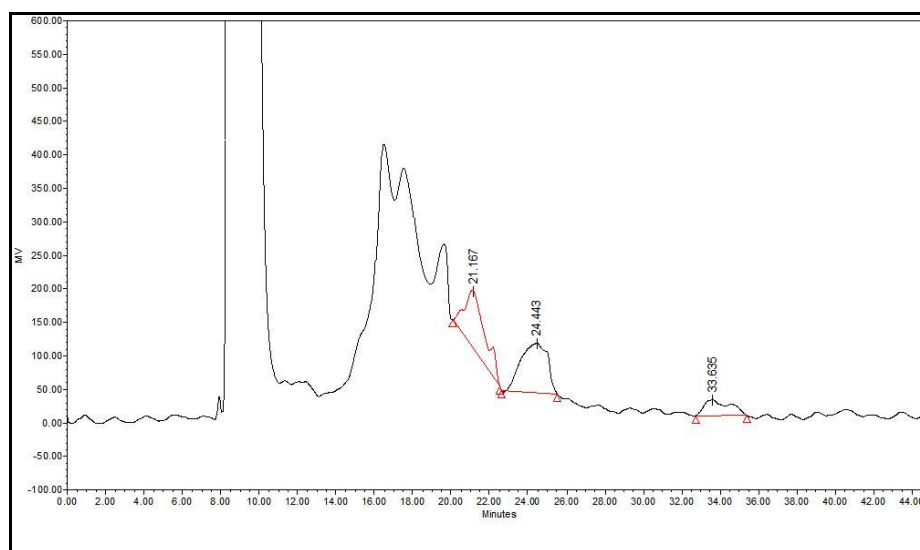
ภาพผนวกที่ ข38 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 500 mM ที่เวลา 12 ชั่วโมง



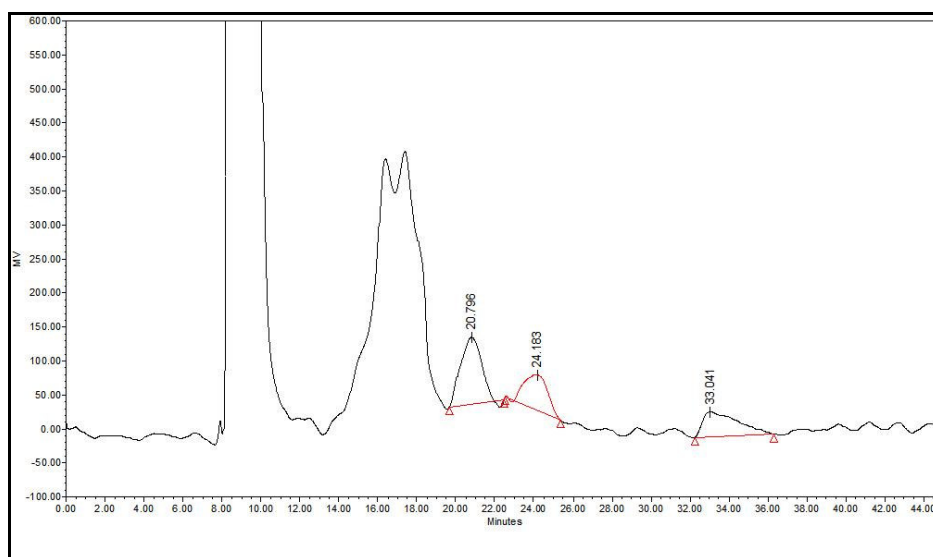
ภาพผนวกที่ ข39 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 500 mM ที่เวลา 24 ชั่วโมง



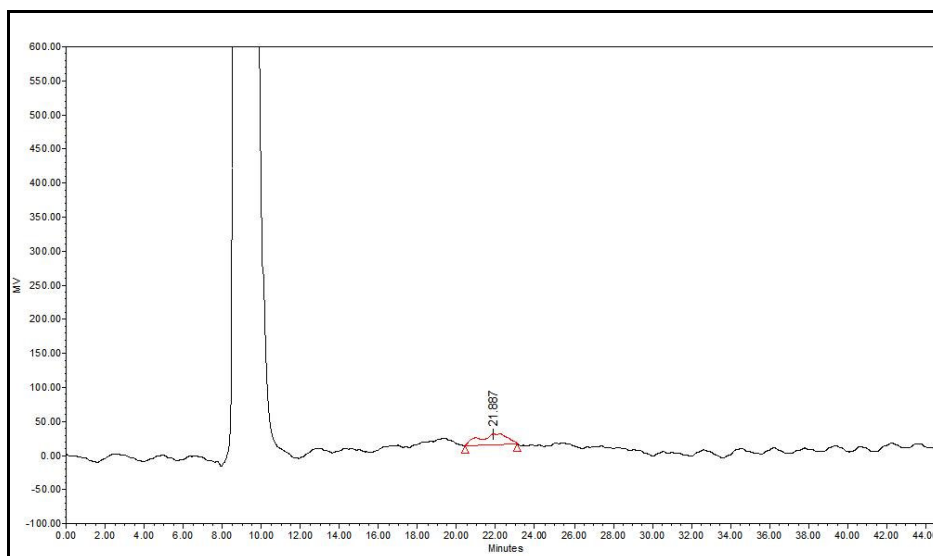
ภาพผนวกที่ ข40 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 500 mM ที่เวลา 3 วัน



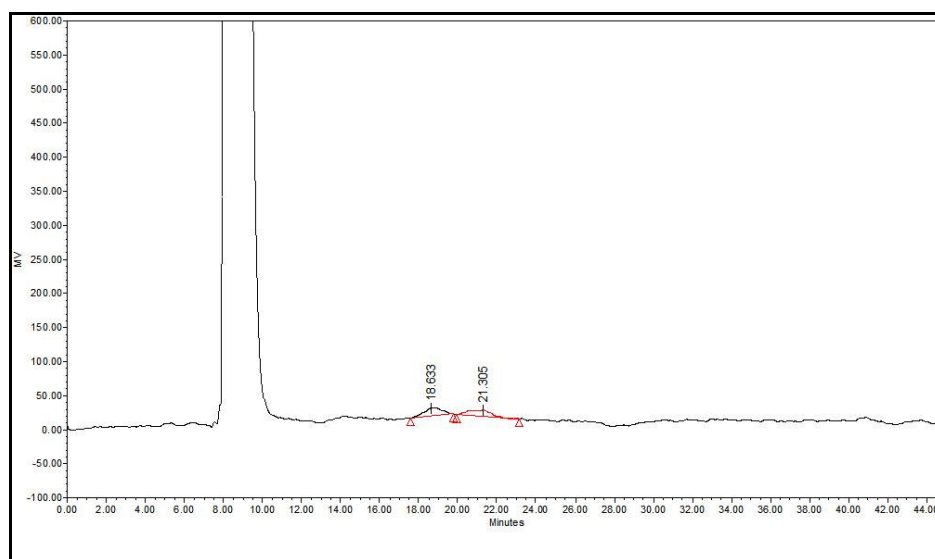
ภาพผนวกที่ ข41 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 500 mM ที่เวลา 5 วัน



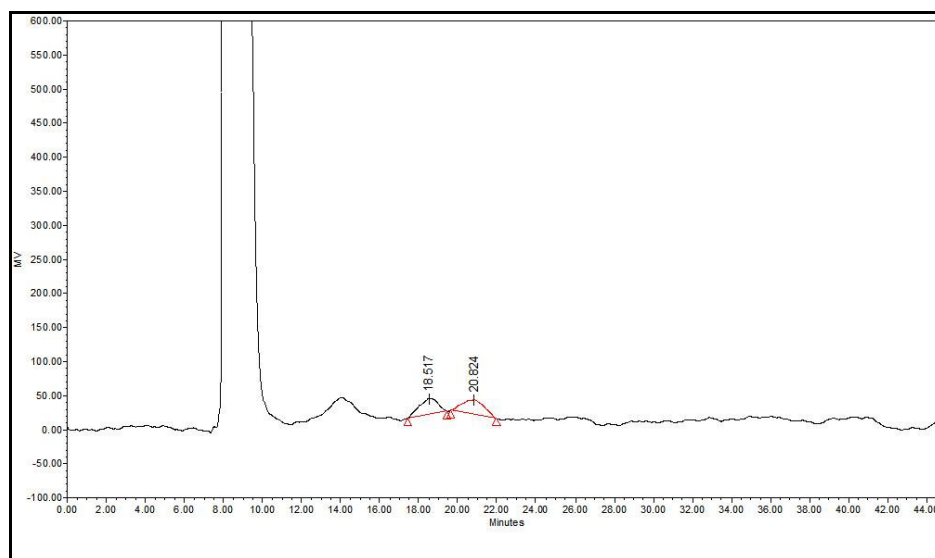
ภาพผนวกที่ ข42 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 500 mM ที่เวลา 7 วัน



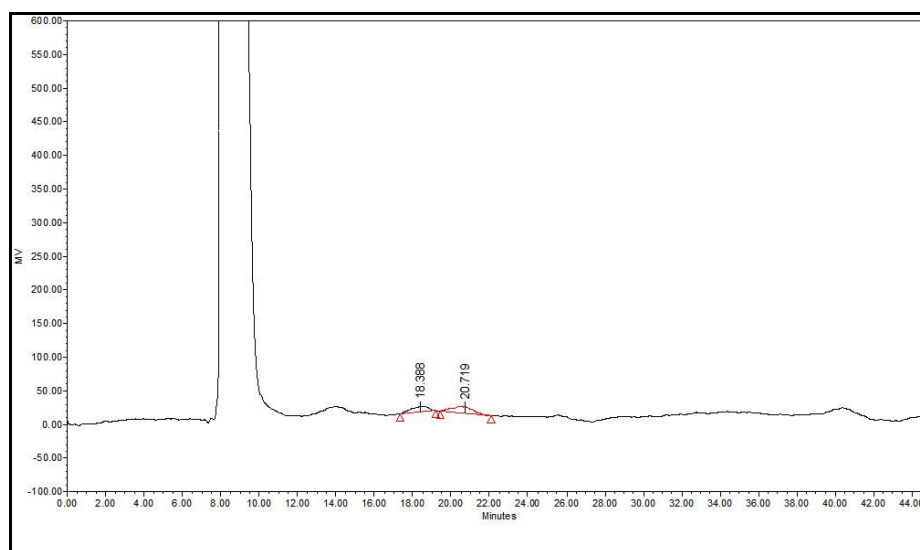
ภาพผนวกที่ ข43 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 600 mM ที่เวลา 0 ชั่วโมง



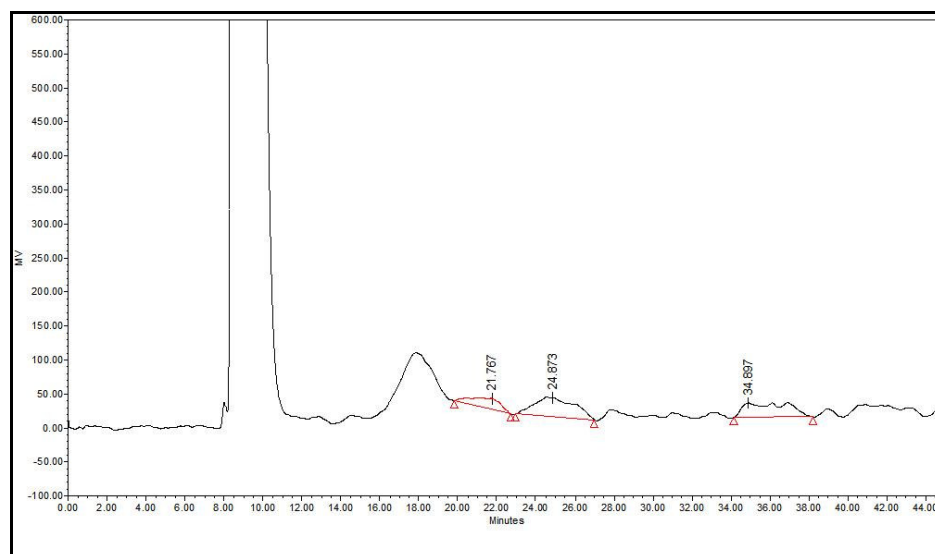
ภาพผนวกที่ ข44 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในไบโหมอนเมื่อได้รับเกลือ 600 mM ที่เวลา 1 ชั่วโมง



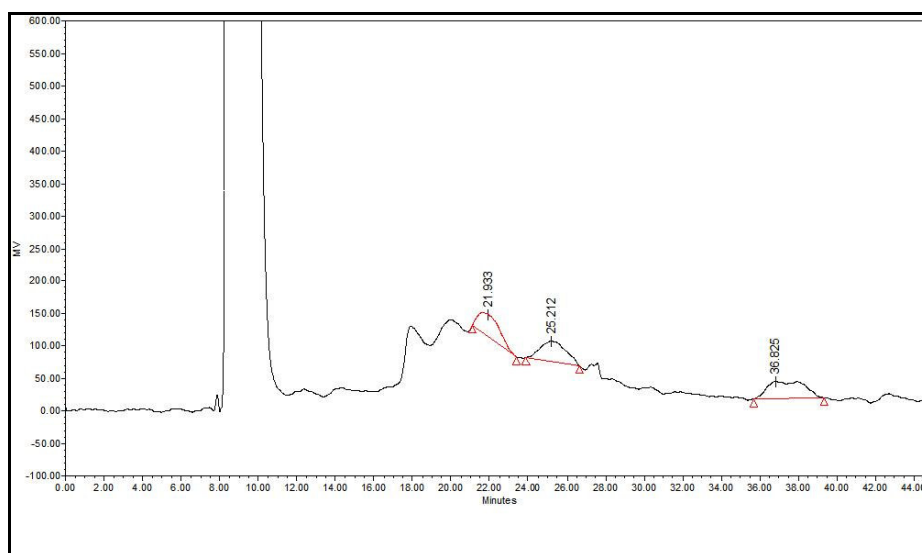
ภาพผนวกที่ ข45 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในไบโหมอนเมื่อได้รับเกลือ 600 mM ที่เวลา 3 ชั่วโมง



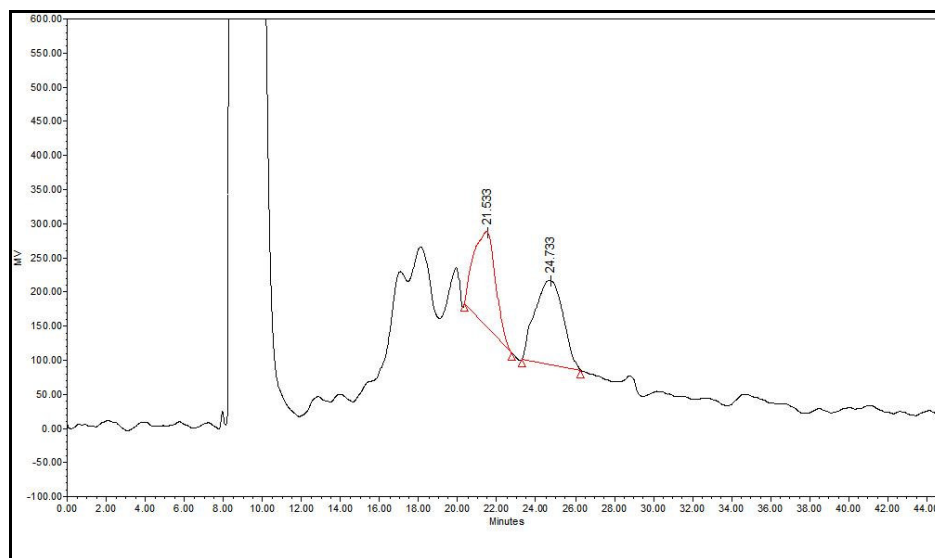
ภาพผนวกที่ ข46 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 600 mM ที่เวลา 6 ชั่วโมง



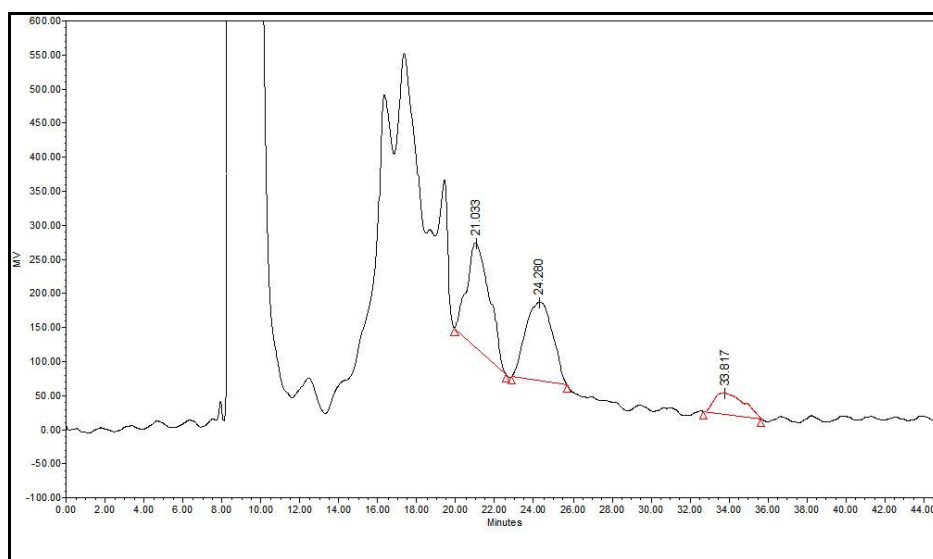
ภาพผนวกที่ ข47 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 600 mM ที่เวลา 12 ชั่วโมง



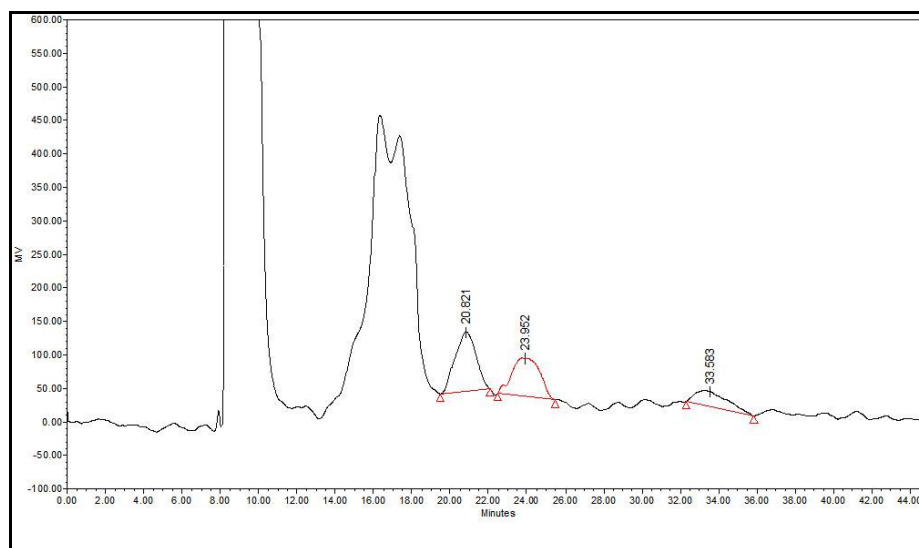
ภาพผนวกที่ ข48 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 600 mM ที่เวลา 24 ชั่วโมง



ภาพผนวกที่ ข49 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 600 mM ที่เวลา 3 วัน



ภาพผนวกที่ ข50 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 600 mM ที่เวลา 5 วัน



ภาพผนวกที่ ข51 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในใบหม่อนเมื่อได้รับเกลือ 600 mM ที่เวลา 7 วัน

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวเนตรนภา ชิ่งกิตติ Miss Netnapa Chingkitti
วัน เดือน ปี ที่เกิด	22 กรกฎาคม 2524
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ.(ชีวเคมี), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นิสิตปริญญาโท
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนบัณฑิตวิทยาลัย ทุนวิจัยมหบัณฑิตของสกว.
ผลงาน	
- February 2006	“Mulberry Leaf Lectin Gene: Intron and Specific Primer Development” The Proceedings of 44 th Kasetsart University Annual Conference (Subject: Science) pp. 507-512.
- December 2006	“Mulberry leaf lectin: purification, cloning and modeling”. The 20 th Congress of the International Sericulture Commission Conference. Papers Volume III. Bangalore, India, pp. 147-149. (oral presentation)
- March 2008	“Salt-stress Response Mechanism of <i>Morus rotundiloba</i> Koidz” Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology. Nagoya, Japan. (poster presentation)
- April 2008	“Salt-Stress Response Mechanism of Mulberry, <i>Morus rotundiloba</i> Koidz” 6 th international Workshop on the Molecular Biology of stress Responses. Bangkok, Thailand, (poster presentation)