

บทที่ 2

การศึกษาแบบแผนของโปรตีนระหว่างพัฒนาการของอวัยวะและเรณูของข้าว

โปรตีนเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีความสำคัญและมีมากที่สุดภายในเซลล์ เป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการต่างๆที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ ทาหน้าที่เป็นโครงสร้างพื้นฐานและการทำงานหลักของเซลล์ (ปุ่นนวล, 2527) มีโครงสร้างเป็นโพลีเมอร์สายยาว มีหน่วยย่อยเป็นกรดอะมิโนจำนวน 20 ชนิด โมเลกุลโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 50 ถึง 2500 หน่วย จำนวนที่แน่นอนขึ้นกับโปรตีนแต่ละชนิด (วีระศักดิ์, 2537)

อิเล็กโตรโฟเรซิส เป็นวิธีการหนึ่งที่มีประโยชน์และใช้กันแพร่หลายในการแยกสารออกจากกันบนสนามไฟฟ้า โดยอาศัยความแตกต่างของชนิดและปริมาณของประจุ รวมทั้งขนาดและรูปร่างของสารตัวอย่าง นอกจากนี้ยังอาศัยปัจจัยอื่นๆที่เหมาะสมที่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของสารสำหรับใช้แยกสารชนิดหนึ่งๆ เช่น ความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์, สนามไฟฟ้า รวมทั้งชนิดและคุณสมบัติของตัวกลางที่วางไว้ เป็นต้น

โพลีเอครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟเรซิส (polyacrylamide gel electrophoresis) ได้ถูกนำมาใช้เพื่อศึกษาโมเลกุลหลายชนิดในสิ่งมีชีวิตที่เป็นพื้นฐานของการศึกษาทางชีวเคมี ได้แก่ โพลีแซ็กคาไรด์ โปรตีน และกรดนิวคลีอิก ซึ่งงานปัจจุบันเป็นวิธีการที่สำคัญสำหรับงานโรงพยาบาล งานพิสูจน์หลักฐาน และทางด้านการเกษตร

SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) เป็นชนิดหนึ่งของอิเล็กโตรโฟเรซิส ที่อาศัยสาร SDS ซึ่งเป็น ionic detergent สามารถจับกับโปรตีน ทำให้ประจุที่แท้จริงของโปรตีนถูกบดบังและโปรตีนทุกตัวแสดงประจุลบเหมือนกันหมดและทำให้โปรตีนทุกตัวเคลื่อนที่บนสนามไฟฟ้าด้วยแรงเคลื่อนไฟฟ้าเดียวกัน การแยกโปรตีนโดยวิธีนี้อาศัยความแตกต่างของขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของสาร

ทำให้สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของสารได้ (โรสคิส, 2529) ซึ่งวิธี SDS-PAGE นี้พัฒนาขึ้นเป็นครั้งแรกโดย Laemmli (1970) และได้ถูกนำมาปรับปรุงใช้กันแพร่หลายในปัจจุบัน (ชัยศิริ, 2529)

การศึกษานการทดลองบทนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีนในแต่ละระยะพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าวโดยการศึกษาด้วยวิธี SDS-PAGE (Laemmli, 1970) และศึกษาถึงอิทธิพลของเกลือที่มีต่อแบบแผนของโปรตีนในระหว่างพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าว

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษา คือ

- ข้าวหอมมะลิ 105 และ กข.23 ที่ปลูกในแปลงทดลอง
- ข้าว กข.23 ที่ทำการปลูกในสารละลายธาตุอาหาร (วิทยา และคณะ, 2529; ภาคผนวก ข ตารางที่ ข.1) ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM

สถานที่ทำการปลูกข้าว

- ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การปลูกข้าว ดำเนินการเหมือนการทดลองในบทที่ 1

วิธีการศึกษาวิจัย

ทำการศึกษแบบแผนของโปรตีนในระหว่างพัฒนาการของอับเรณูและละอองเรณูของข้าวด้วยวิธี SDS-PAGE (Laemmli, 1970) ดังนี้คือ

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บและแยกอับเรณูจากดอกสตอกเป็นกลุ่มตามระยะพัฒนาการของเรณู คือ ไมโครสปอร์ไรท์, ไมโครซิส, ไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลโลส, ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส, เรณูมี 2 นิวเคลียสและเรณูมี 3 นิวเคลียส โดยใช้เกณฑ์การแยกที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3 ของการทดลองที่ 1 และเก็บใบจากต้นที่ช่อดอกมีผลพันบาง นำมาแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวและเก็บที่ -70°C .

2. การเตรียมน้ำชะกักจากอับเรณู

นำอับเรณูมาบดในไนโตรเจนเหลวในกรงที่แช่แข็งจนเป็นผงละเอียด จากนั้นเติมสารละลายสำหรับบด (Grinding buffer) แล้วนำของเหลว (homogenate) มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยง จากนั้นแบ่งของเหลวใส (supernatant) ที่ได้จากปั่นเหวี่ยงมาทำการวัดหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976) และ ใช้โปรตีนบรวยซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) เป็นโปรตีนมาตรฐาน ของเหลวใสส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่ -70°C .

3. การเตรียมพลีเอคิลาไมต์เจล

นำกระจกขนาด 16x18 ซม. 2 แผ่นประกบกัน ระหว่างกระจกทั้งสองใส่แถบให้ความหนาของเจล (spacer) แล้วนำมาประกอบเข้ากับเครื่องเตรียมเจล เติมสารละลายสำหรับเจลชั้นแยกสาร (separating gel) (ภาคผนวก ข ตารางที่ ข.2) 2/3 ของปริมาตรกระจกกลางระหว่างกระจกทั้งสอง แล้วเติมน้ำเล็กน้อยเพื่อปรับผิวหน้าเจลให้เรียบ รอให้เจลแข็งตัว (polymerized) ประมาณ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเทน้ำที่ผิวหน้าเจลออกใส่สารละลายสำหรับเจลชั้นเตรียมสารให้อยู่ในระดับเดียวกัน (stacking gel) จนเต็มแผ่นเจลพร้อมทั้งใส่หวี (comb) ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็งตัวแล้วนำหวีออก และล้างเอาส่วนของเจลชั้นเตรียมสารให้อยู่ในระดับเดียวกันที่น้ำแข็งตัวออกจากช่องเจล (well) โดยใส่สารละลายรันนิ่งบัฟเฟอร์ (running buffer) ล้าง 2-3 ครั้ง จากนั้นนำแผ่นกระจกที่มีเจลประกอบเข้ากับเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสและเติมสารละลายรันนิ่งบัฟเฟอร์ลงในถังบนและล่างของเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส

4. การแยกโปรตีน

นำของเหลวที่สกัดได้ในข้อ 3 มา 70 ug. และเติมน้ำที่มีปริมาตรเท่ากันทุกตัวอย่าง แล้วนำมาผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับเติมสารตัวอย่าง (loading buffer) ที่มีความเข้มข้น 5 เท่า ในอัตราส่วน 4 ต่อ 1 นำมาต้ม 3 นาที จากนั้นนำมาเติมลงในช่องเจลและเติมโปรตีนมาตรฐาน (Bio-Rad's SDS-PAGE Molecular Weight standards) ไว้หัวท้ายของช่องเจล เปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้า 120 โวลต์ จนสังเกตเห็นแถบสีโปรตีนโอลบลูเคลื่อนจนถึงระยะห่างจากปลายล่างของกระจกประมาณ 1 ซม. จึงปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้า

5. การย้อมแถบของโปรตีน

นำแผ่นเจลที่ได้จากข้อ 4 มาย้อมด้วยสารละลายโคมัสซี บริลเลียน บลู อาร์-250 (Coomassie Brilliant Blue R-250) อย่างน้อย 45-60 นาที จากนั้นล้างสีส่วนเกินออกให้หมดด้วยสารละลายดีสเทน I และ II (Destain I, II) จนกระทั่งเจลที่ไม่มีโปรตีนอยู่สีก้อนเจลที่ได้นักเลเซอร์ 10 % หรือ ทาให้แห้ง นำมาศึกษาแบบแผนของโปรตีน โดยเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนมาตรฐาน จากกราฟมาตรฐานที่มีแกน x มีค่าเป็นน้ำหนักโมเลกุล และแกน y เป็นระยะทางการเคลื่อนที่สัมพันธ์ของแถบโปรตีนมาตรฐาน

$$\text{ระยะทางการเคลื่อนที่สัมพันธ์} = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่แถบสีโปรตีนโอลบลูเคลื่อนที่}}$$

ผลการทดลอง

จากการศึกษาแบบแผนของโปรตีนในระหว่างพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าวใน 5 ระยะพัฒนาการคือ ไมโครสปอร์ไรซ์, ไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลโลส, ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส, เรณูมี 2 นิวเคลียสและเรณูมี 3 นิวเคลียส โดยศึกษาในข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105, กข.23 ที่ปลูกในแปลงทดลองและ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM ด้วยวิธี SDS-PAGE ศึกษาโปรตีนในช่วง 14.4 ถึง 97.5 kD ได้ผลการทดลองดังนี้คือ

แบบแผนของโปรตีนในข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 ที่ปลูกในแปลงทดลอง (ภาพที่ 24 A) พบโปรตีนขนาด 25 kD (ลูกศร a) ตั้งแต่ระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียสถึงระยะเรณูมี 2 นิวเคลียส พบแถบโปรตีนขนาด 15 และ 14 kD (ลูกศร b และ c ตามลำดับ) เฉพาะใน ระยะเรณูมี 3 นิวเคลียส พบโปรตีนขนาดต่ำกว่า 14 kD 2 แถบ (ลูกศร d และ e ตามลำดับ) เฉพาะในระยะเรณูมี 2 นิวเคลียส และพบโปรตีนในช่วง 14.4 ถึง 97.5 kD ในทุกระยะพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าว และพบโปรตีนในบางแถบที่มีความชัดเจนมาก เช่น แถบลูกศร f และ g มีขนาดของโปรตีนเท่ากับ 50 และ 15 kD ตามลำดับ

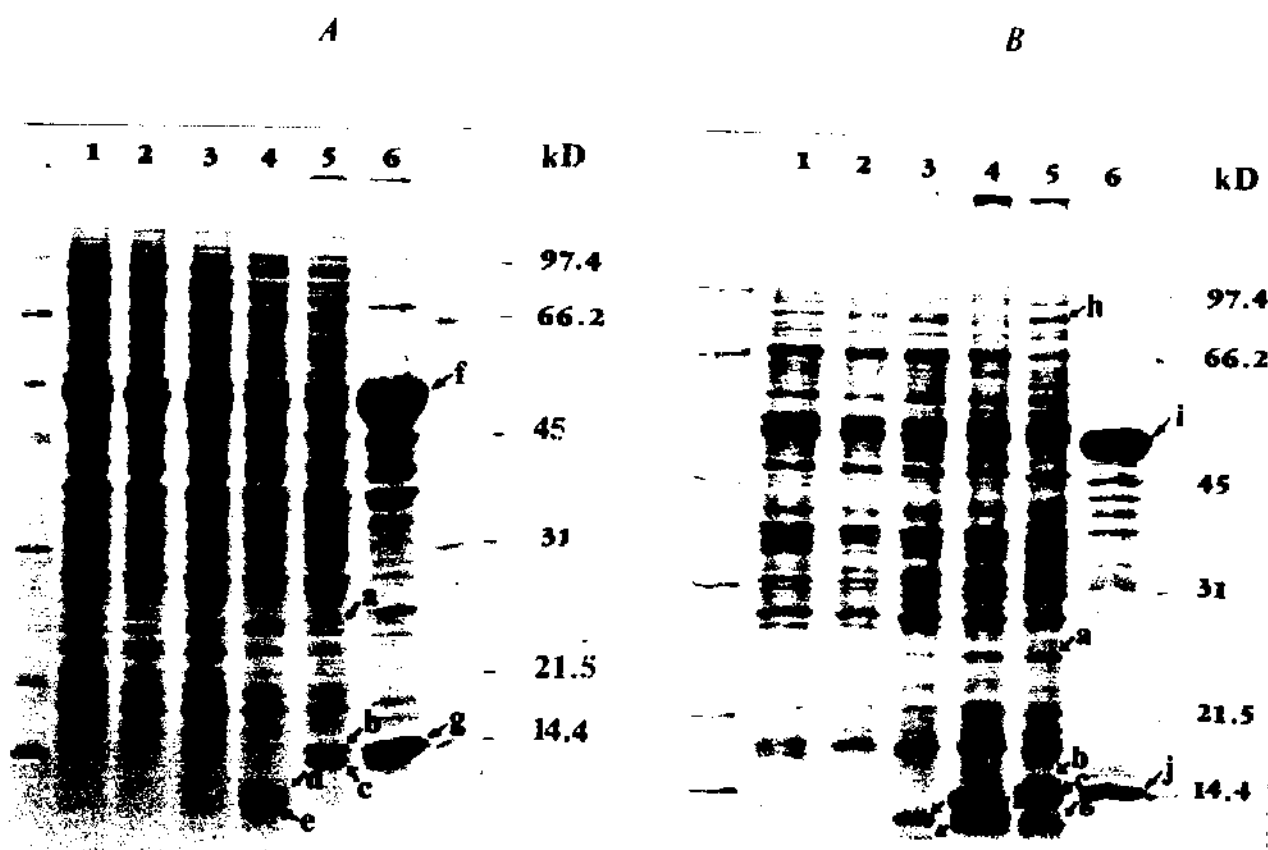
แบบแผนของโปรตีนในข้าวพันธุ์ กข.23 ที่ปลูกในแปลงทดลอง (ภาพที่ 24 B) พบโปรตีนขนาด 25 kD (ลูกศร a) ตั้งแต่ระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียสถึงระยะเรณูมี 3 นิวเคลียส พบแถบโปรตีน 15 และ 14 kD (ลูกศร b และ c) เฉพาะในระยะเรณูมี 3 นิวเคลียส พบโปรตีนขนาดต่ำกว่า 14 kD (ลูกศร d, e, f และ g) ตั้งแต่ระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียสถึงระยะเรณูมี 3 นิวเคลียส โปรตีนที่มีความชัดเจนมากที่สุดในระยะเรณูมี 2 นิวเคลียส (แถบ f) และพบโปรตีน ขนาด 82 kD มีความชัดเจนในระยะเรณูมี 3 นิวเคลียส และพบโปรตีนในช่วง 14.4 ถึง 97.5 kD ในทุกระยะพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าวและพบโปรตีนในบางแถบที่มีความชัดเจนมาก เช่น แถบลูกศร i และ j มีขนาดของโปรตีนเท่ากับ 50 และ 15 kD ตามลำดับ

แบบแผนของโปรตีนในข้าวพันธุ์ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือ โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0 mM (ภาพที่ 25 A) พบโปรตีนขนาด 25 kD (ลูกศร a) ตั้งแต่ระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียสถึงระยะเรณูมี 3 นิวเคลียส พบแถบโปรตีน 15 และ 14 kD (ลูกศร b และ c) เฉพาะในระยะเรณูมี 3 นิวเคลียส พบโปรตีนขนาดต่ำกว่า 14 kD (ลูกศร d) ตั้งแต่ระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียสถึงระยะเรณูมี 3 นิวเคลียส เป็นโปรตีนที่มีความชัดเจนมากที่สุดในระยะเรณูมี 2 นิวเคลียสและพบโปรตีนในช่วง 14.4 ถึง 97.5 kD ในทุกระยะพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าว และพบโปรตีนในใบแก่ที่มีความชัดเจนมาก เช่น แถบลูกศร e และ f มีขนาดของโปรตีนเท่ากับ 50 และ 15 kD ตามลำดับ

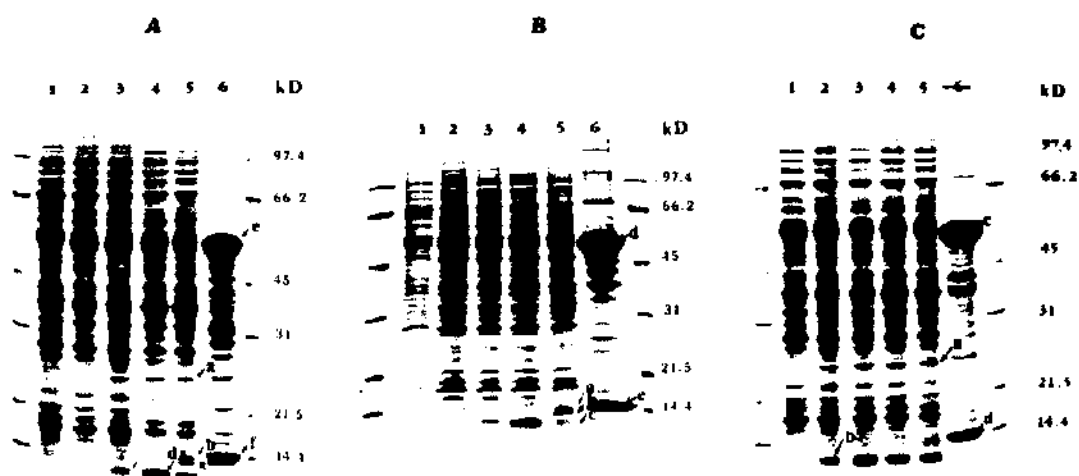
แบบแผนของโปรตีนในข้าวพันธุ์ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือ โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 20 mM (ภาพที่ 25 B) ไม่พบโปรตีนขนาด 25 kD ว่าง มีความแตกต่างในแต่ละระยะพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าวพบโปรตีนขนาด 15 และ 14 kD (ลูกศร a และ b) เฉพาะในระยะเรณูมี 3 นิวเคลียส พบโปรตีนขนาดต่ำกว่า 14 kD (ลูกศร c) ตั้งแต่ระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียสถึงระยะเรณูมี 3 นิวเคลียส เป็นโปรตีนที่มีความชัดเจนมากที่สุดในระยะเรณูมี 2 นิวเคลียส และพบโปรตีนในช่วง 14.4 ถึง 97.5 kD ในทุกระยะพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าว และพบโปรตีนในใบแก่ที่มีความชัดเจนมากเช่นแถบลูกศร e และ f มีขนาดของโปรตีนเท่ากับ 50 และ 15 kDตามลำดับ นอกนั้นพบว่า เป็นแถบโปรตีนที่มีการแสดงออกในทุกระยะพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าว โดยพบว่า ส่วนใหญ่จะเป็นแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 31-97 kD และพบว่า จำนวนแถบของโปรตีนที่พบในระหว่างพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าวจะมากกว่าจำนวน แถบของโปรตีนที่พบในใบแก่ ซึ่งจะพบว่าแถบของโปรตีนที่พบในใบแก่จะมีความเข้มข้นของแถบโปรตีนมากอยู่ไม่กี่แถบ เช่น แถบลูกศร d และ e

แบบแผนของโปรตีนในข้าวพันธุ์ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือ โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 40 mM (ภาพที่ 25 C) พบโปรตีนขนาดต่ำกว่า 14.1 และ 25 kD (ลูกศร a และ b) ตั้งแต่ระยะไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลโลสถึงระยะเรณูมี 3 นิวเคลียสและพบโปรตีนในช่วง 14.4 ถึง 97.5 kD ในทุกระยะพัฒนาการของอับเรณูและเรณู

ของข้าว และพบโปรตีนในใบแก่ที่มีความชัดเจนมาก เช่น แอลบูมิน e และ f มีขนาดโปรตีนเท่ากับ 50 และ 15 kD ตามลำดับ นอกนั้นพบว่า เป็นแถบโปรตีนที่มีการแสดงออกในทุกระยะพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าว โดยพบว่า ส่วนใหญ่จะเป็นแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 31-97 kD และพบว่า จำนวนแถบของโปรตีนที่พบในระหว่างพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าวจะมากกว่าจำนวนแถบของโปรตีนที่พบในใบแก่ ซึ่งจะพบว่าแถบของโปรตีนที่พบในใบแก่จะมีความเข้มของแถบโปรตีนมากอยู่ไม่กี่แถบ เช่น แอลบูมิน d และ e



ภาพที่ 24 แสดงแบบแผนของโปรตีนของอับเรณูที่เรณูระยะต่างๆ และของใบแก่ของข้าว 2 สายพันธุ์คือ (A) ข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 และ (B) ข้าวพันธุ์ กข.23 ที่ปลูก วนแปลงทดลอง ปริมาณโปรตีนต่อหนึ่งตัวอย่างเท่ากับ 70 ไมโครกรัม
 (1) ไมโครสปอร์ไรซ์ (2) ไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลลอส
 (3) ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส (4) เรณูมี 2 นิวเคลียส
 (5) เรณูมี 3 นิวเคลียส (6) าบจากต้นที่ช่อดอกกำลังพัฒนา



ภาพที่ 25 แสดงแบบแผนของโปรตีนของอันเรอูที่เรอูระยะต่างๆ และของใบแก่ของข้าวพันธุ์ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM ปริมาณโปรตีนต่อหนึ่งตัวอย่างเท่ากับ 70 ไมโครกรัม
 (1) ไมโครสปอร์โรซท์ (2) ไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลโลส
 (3) ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส (4) เรอูมี 2 นิวเคลียส
 (5) เรอูมี 3 นิวเคลียส (6) ใบจากต้นที่ช่อดอกใกล้พ้นใบธง

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาแบบแผนของโปรตีนในระหว่างพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าวโดยใช้ SDS-PAGE ของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 และ กข.23 ที่ปลูกในแปลงทดลอง ข้าวทั้งสองพันธุ์มีแบบแผนของโปรตีนส่วนใหญ่เหมือนกันโดยพบโปรตีน 3 ขนาดคือ 25, 15 และ 14 kD เฉพาะในบางระยะพัฒนาการของเรณู โปรตีนขนาด 25 kD พบตั้งแต่ระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียสถึงระยะเรณูมี 3 นิวเคลียส โปรตีนขนาด 15 และ 14 kD พบเฉพาะในระยะเรณูมี 3 นิวเคลียส นอกจากนี้ยังพบโปรตีนขนาดต่ำกว่า 14.4 kD เฉพาะในระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียสและระยะเรณูมี 3 นิวเคลียสในข้าว กข.23 แต่ไม่พบในข้าวหอมมะลิ 105 และพบว่า ข้าวทั้งสองพันธุ์มีจำนวนแถบของโปรตีนในระหว่างพัฒนาการของอับเรณูและเรณูมากกว่าในใบแก่จากต้นระยะช่อดอกโผล่พ้นใบธง แต่มีบางแถบโปรตีนของใบแก่ที่มีความชัดเจนมากกว่าที่พบในระหว่างพัฒนาการของอับเรณูและเรณูคือ โปรตีนขนาด 15 และ 50 kD เป็นต้น เกลือโซเดียมคลอไรด์มีผลต่อแบบแผนของโปรตีนของข้าว กข.23 คือที่ความเข้มข้น 20 mM มีผลทำให้โปรตีนขนาด 25 kD จางลงและที่ความเข้มข้น 40 mM ทำให้เกิดแถบโปรตีนขนาดต่ำกว่า 14.4 และ 25 kD ตั้งแต่ระยะไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลลอสถึงระยะเรณูมี 3 นิวเคลียส

จากการศึกษาผลของเกลือโซเดียมที่มีต่อแบบแผนโปรตีนในระหว่างพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าว กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM พบว่า เกลือโซเดียมคลอไรด์มีผลต่อแบบแผนของโปรตีนของข้าว กข.23 โดยที่ความเข้มข้น 20 mM มีผลทำให้โปรตีนขนาด 25 kD จางลงและที่ความเข้มข้น 40 mM ทำให้เกิดแถบโปรตีนขนาดต่ำกว่า 14.4 และ 25 kD ตั้งแต่ระยะไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลลอสถึงระยะเรณูมี 3 นิวเคลียส และโปรตีนทั้งสองขนาดที่พบในระยะต่างๆ ดังกล่าวมีความชัดเจนเท่ากัน ซึ่งปกติโปรตีนทั้งสองขนาดนี้ที่พบในข้าว กข.23 ที่ปลูกในแปลงทดลองและที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (0 mM) พบตั้งแต่ระยะไมโครสปอร์มี 2 นิวเคลียสถึงระยะเรณูมี 3 นิวเคลียสและโปรตีนขนาดต่ำกว่า 14.4 kD ที่มีความชัดเจนมากที่สุดในระยะเรณูมี 2 นิวเคลียส

แบบแผนของโปรตีนในระหว่างพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าวที่ศึกษา พบว่า มีความแตกต่างกับแบบแผนของโปรตีนในระหว่างพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของพืชอื่น เช่น เช่น 1) แบบแผนโปรตีนของ *L. longiflorum* ที่ศึกษาโดย Wang และคณะ (1992) ซึ่งแบ่งระยะพัฒนาการของอับเรณูออกเป็น 3 ระยะตามขนาดของกลุ่มโปรตีนคือ ระยะที่ 1 เริ่มจากการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อในท่อนำละอองเรณู พบโพลีเปปไทด์ 3 ขนาด คือ 31.6, 18.0 และ 14.0 kD ระยะที่ 2 เริ่มจากระยะไมโครสปอร์ไรซ์ที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสถึงระยะไมโครสปอร์ที่มีการเจริญเต็มที่ พบโพลีเปปไทด์ 8 ขนาด โดยโพลีเปปไทด์ขนาด 15 kD พบมากในระยะนี้ ระยะที่ 3 เป็นระยะไมโครสปอร์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโทซิสถึงระยะเรณูที่มีการเจริญเต็มที่ พบโพลีเปปไทด์ 4 ขนาดคือ 36.5, 33.0, 32.4, 22.2 kD 2) แบบแผนโปรตีนของข้าวสาลี ที่ศึกษาโดย Vergne และคณะ (1988) ซึ่งรายงานว่ามีโปรตีนขนาด 18 kD ในทุกระยะพัฒนาการของเรณูและมีความเข้มข้นของแถบโปรตีนเท่ากันและมีโปรตีนขนาด 32 kD ที่มีความเข้มข้นของแถบโปรตีนเพิ่มขึ้นตั้งแต่ระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียสขึ้นไป

ผลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปสู่การศึกษาโปรตีนที่มีเฉพาะใน ระยะใดระยะหนึ่งของการพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าว เช่น ทำการแยกแถบโปรตีน ที่สนใจนั้นออกมา นำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี preparative gel electrophoresis แล้วนำโปรตีนนั้นมากระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในสัตว์ทดลองเช่น กระต่ายหรือหนูได้ ซึ่งแอนติบอดีที่ได้นี้ สามารถนำมาใช้เป็นตัวตรวจตามโปรตีนที่เป็นผลผลิตของจีนจาก cDNA expression library ที่มีดีเอ็นเอที่ต้องการได้ หรือ นำไปวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนนั้น และ นำไปสู่การสังเคราะห์ตัวตรวจตามจากลำดับกรดอะมิโนที่ได้เป็นขั้นตอนต่อไป ตัวตรวจตามนี้จะสามารถนำมาใช้เป็นตัวตรวจเลือกจีนจาก cDNA library ได้ ซึ่งถ้าจีนที่ได้เป็นจีนที่ควบคุมลักษณะที่ดีของสายพันธุ์ข้าว การถ่ายทอดจีนนี้เข้าไปในพันธุ์ข้าวที่มีคุณลักษณะเด่นอื่นๆ ก็จะแนวทางหนึ่งในการผลิตข้าวสายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณลักษณะที่ดีเพิ่มขึ้นได้