

การศึกษาโปรตีนของเอนไซม์ในระหว่างพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าว

วิธีการแยกสารชีวโมเลกุลโดยทั่วไป มักอาศัยความแตกต่างๆของ ขนาด ประจุ และคุณสมบัติจำเพาะทางชีวภาพหรือทางเคมีของสารนั้นๆ ไรโซไซม์เป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่และมีความจำเพาะต่อสับสเตรทเหมือนกัน แต่มีโครงสร้างของโมเลกุลแตกต่างกัน สามารถทำการแยกความแตกต่างของรูปร่างทางโมเลกุลได้โดยใช้เทคนิคทางชีวเคมี เช่น การทำโครมาโทกราฟี (Chromatography), การทำเจลฟิวเทชั่น (Gel filtration), การทำให้เกิดการตกตะกอน (Sedimentation), การแยกสารออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า (Electrophoresis) และวิธีการทางน้ำเหลืองวิทยา (Serological method) ซึ่งการแยกไรโซไซม์มักนิยมใช้วิธีการแยกสารออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า (Peirce และ Brewbaker, 1973)

การศึกษาไรโซไซม์มีมากกว่า 30 ปีแล้ว มีรายงานถึงความจำเพาะของไรโซไซม์ต่อสายพันธุ์พืช เนื้อเยื่อและออร์แกเนลล์ ระยะการเจริญเติบโตของพืช ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมที่ปลูกและฤดูกาล (บุณศิริกาน หาริสุต, 2534) เช่น จากการศึกษาเอนไซม์ฟอสฟอกลูโคสไอโซเมอเรสของ Gottlieb (1982) ใน *Clarkia xantiana* และ *C. dudleyana* พบว่า เอนไซม์ชนิดนี้มีการกระจายในแต่ละส่วนของพืชต่างกัน โดยโปรตีนแกรมของเอนไซม์ที่ได้จากสารสกัดของเรณูต่างจากที่พบในสารสกัดที่ได้มาจากใบ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความจำเพาะของเอนไซม์ที่มีหน้าที่ในส่วนต่างๆของพืชแตกต่างกัน Bassiri และ Adams (1977) ได้ศึกษาเอนไซม์เอสเตอเรส, แอซิด ฟอสฟาเตส, เพอร์ออกซิเดส ส่วนของราก ลำต้น และใบในพืชตระกูล Phaseolus 13 ชนิด โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งยังเป็นตัวกลางในการเคลื่อนที่ผ่านของสาร พบว่า Phaseolus ชนิดหนึ่งมีโปรตีนแกรมของเอนไซม์ชนิดหนึ่งๆ ในเนื้อเยื่อแต่ละส่วนแตกต่างกัน และ Phaseolus ต่างชนิดกันนั้น เนื้อเยื่อส่วนเดียวกันมีโปรตีนแกรมของเอนไซม์ชนิดเดียวกันแตกต่างกัน นอกจากนี้ ศิริลักษณ์

เอี่ยมธรรม (2532 อ้างตาม Sheen และRebagay, 1970; Birecka, Shih และ Galston, 1972; Scandalios, 1974) รายงานว่า ไอโซไซม์เพอร์ออกซิเดส อาจช่วยเร่งปฏิกิริยาการสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลในใบที่มีพัฒนาการเต็มที่ ซึ่งพบว่า ในส่วนของลำต้นที่เริ่มมีพัฒนาการสูงขึ้นจะเกิดกระบวนการสร้างลิกนินขึ้นมากกว่าในส่วนของต้นอ่อน และพบกิจกรรมของไอโซไซม์เพอร์ออกซิเดสสูงขึ้นในส่วนของลำต้นที่แก่กว่าในส่วนต้นอ่อน จะเห็นได้ว่า รูปแบบไอโซไซม์มีความแตกต่างกันไปตามต้นพืชแต่ละส่วนตามหน้าที่ทางสรีรวิทยาต่างๆ และสภาวะการพัฒนาของพืช

การศึกษานการทดลองบทนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาโปรแกรมของเอนไซม์ในระหว่างพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าว พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษา คือ ข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105, กข.23 ที่ปลูกในแปลงทดลองและ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM ศึกษาโปรแกรมของเอนไซม์โดยใช้วิธี สตาร์ชเจลอเล็กโตรโฟรีซิส (starch gel electrophoresis; Glazemann และคณะ, 1988) ชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษา คือ เอสเตอเรส, ลิพซินอะมิโนเปปติเดส, อาร์จินินอะมิโนเปปติเดส, จีทีเมตคัลไฮโดรจีเนส, กลูตาเมตออกซาลอะซิเตตทรานสอะมิเนส และ ฟอสโฟกลูโคสไอโซเมอเรส

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษา คือ

- ข้าวพันธุ์ หอมมะลิ 105 และ กข.23 ที่ปลูกในแปลงทดลอง
- ข้าวพันธุ์ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหาร (วิทยา และคณะ, 2529; ภาคผนวก ข ตารางที่ ข.1) ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM

สถานที่ทดลอง

- ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การปลูกข้าว คาเนินการเหมือนการทดลองงานบทที่ 1

การเก็บตัวอย่าง

เก็บและแยกอับเรณูจากดอกสดออกเป็นกลุ่มตามระยะพัฒนาการของเรณู คือ
 1. ไม้โครสปอร์โรเซา, ไม้โครสปอร์หลุดจากผนังแคลโลส, ไม้โครสปอร์มี 1 นิวเคลียส,
 เรณูมี 2 นิวเคลียส และเรณูมี 3 นิวเคลียส โดยใช้ผลที่ศึกษานข้อ 2 จากการทดลองที่
 1 เป็นเกณฑ์การแยกและเก็บมาจากต้นที่ช่อดอกโผล่พ้นใบธง นำมาแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว
 และเก็บที่ -70 ช.

การศึกษาโปรแกรมของเอนไซม์ โดยใช้วิธี สตาร์ชเจลิอิเล็กโตรโฟเรซิส (Glazemann
 และคณะ, 1988)

ชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษา คือ

- เอสเตอเรส
 (Esterase; EST; E.C.3.1.1.-)
- ลิวซีนอะมิโนเปปติเดส
 (Leucine aminopeptidase; LAP; E.C.3.4.1.-)
- อาร์จินีนอะมิโนเปปติเดส
 (Arginine aminopeptidase; AMP; E.C.3.4.1.-)
- ฟอสโฟกลูโคสไอโซเมอเรส
 (Phosphoglucose isomerase; PGI; E.C.5.3.1.9)
- ชิควิเมตดีไฮโดรจีเนส
 (Shikimate dehydrogenase; SDH; E.C.-)
- กลูตาเมตออกซาลอะซิเตททรานสอะมิเนส
 (Glutamate oxaloacetate transaminase; GOT; E.C.2.6.1.1)

วิธีการศึกษาวิจัย

1. การเตรียมน้ำสกัดจากอวัยวะและใบของข้าว

นำอวัยวะที่ต้องการศึกษาและต้นอ่อนของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 อายุ 7 วัน มาบดจนแหลมที่แช่เย็น เติมน้ำเป็นทีผสม 0.1 % เมอร์แคปโทเอทานอล (Mercaptoethanol) 1-2 หยด บดจนเป็นของเหลว

2. การเตรียมสตาร์ช เจล

สตาร์ช เจล เตรียมได้โดยละลายแป้งมันฝรั่ง (Potato starch) 77 กรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่จำเพาะต่อเอนไซม์แต่ละชนิด (ภาคผนวก ข ตารางที่ ข.3) 27.5 มล. แล้วรับด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 550 มล. จากนั้นนำแป้งไปต้มบนสอทเพลท (hot plate) ที่มีแม่เหล็กวนอยู่ตลอดเวลาจนได้สารละลายใสเป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปตั้งอากาศออก (degas) จากนั้นเทใส่ถาด (gel mold) สำหรับทำอิลีคโตรโฟรีซิสและเข้าช่องอากาศออกปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องแล้วปิดหน้าเจลด้วยพลาสติก นำไปแช่ไว้ในตู้เย็นให้เจลเย็นก่อนนำมาใช้ในการศึกษาทางอิลีคโตรโฟรีซิส

3. การแยกไอโซเอนไซม์

นำแถบกระดาษกรองขนาด 0.5×2.0 ซม. มาชุบน้ำสกัดจากอวัยวะไว้ตัวอย่างละ 1 แผ่นแล้วนำไปเสียบบนร่องเจลที่กรีดด้วยใบมีดและมีใบรวมพื้นอลูมิเนียมที่วางบนร่องเจล 1-2 หยด สำหรับใช้เป็นสื่อนำในการติดตามดูการเคลื่อนที่ของสาร นำแถบกระดาษกรองขนาด 0.5×2.0 ซม. มาชุบน้ำสกัดจากต้นอ่อนของข้าวพันธุ์ หอมมะลิ 105 อายุ 7 วัน ไว้เป็นตัวอย่างเปรียบเทียบการแยกเอนไซม์ไว้ห้วท้ายของร่องเจลทุกครั้งทีทดลอง จากนั้นเปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้า 200 โวลท์ จนสังเกตเห็นแถบสีใบรวมพื้นอลูมิเนียมเคลื่อนจนถึงระยะห่างจากปลายล่างของกระดาษประมาณ 1 ซม. จึงปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้า (การศึกษาไอโซแกรมของเอนไซม์ขณะเปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้าควรรักษาความเป็นน้ำให้แผ่นเจลตลอดเวลา)

4. การย้อมแถบไอโซไซม์

นำแผ่นเจลที่ได้จากข้อ 3 มาย้อมด้วยยาลับสเตรทที่จำเพาะต่อไอโซไซม์ชนิดนั้นๆ ตามวิธีการย้อมไอโซไซม์ชนิดต่างๆ ในภาคผนวก ข. (การทำสตาร์ชเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส 1 ครั้ง สามารถตัดแบ่งเจลตามยาวในทิศทางการวิ่งของไอโซไซม์ได้หลายแผ่นแล้วนำมาศึกษาไอโซไซม์ได้หลายชนิด) ศึกษาโปรแกรมของเอนไซม์โดยอ่านค่าเป็นระยะทางการเคลื่อนที่สัมพัทธ์

$$\text{ค่าสัมประสิทธิ์ของการเคลื่อนที่} = \frac{\text{ระยะที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่แถบสีบรมพินอลบลูเคลื่อนที่}}$$

ผลการทดลอง

จากการศึกษาโปรแกรมของเอนไซม์ชนิดต่างๆในแต่ละระยะพัฒนาการของเรณูของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105, กข.23 ที่ปลูกในแปลงทดลอง และ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM ได้ผลดังนี้คือ

1. การศึกษาโปรแกรมของเอนไซม์เอสเตอเรส

ข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 ที่ปลูกในแปลงทดลอง นับความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของไอโซไซม์เอสเตอเรสที่ไปยังหัววงได้ 6 แถบ คือ a, b, c, d, e และ f มีค่าสัมประสิทธิ์ของการเคลื่อนที่เท่ากับ 0.61, 0.58, 0.51, 0.50, 0.42, 0.38 ตามลำดับ (ภาพที่ 26 A และ ตารางที่ 7) และพบไอโซไซม์เอสเตอเรสที่เคลื่อนที่ไปยังหัววง 1 แถบเป็นแถบที่มีความชัดเจนของแถบสีใกล้เคียงกันในทุกระยะพัฒนาการของเรณู แถบ a และ b เป็นแถบที่มีการเคลื่อนที่ไปยังหัววงและเคลื่อนที่ไปได้ไกลที่สุดตามลำดับ มีความชัดเจนของแถบสีมากกว่าแถบอื่นๆ มากและพบว่า ความชัดเจนของแถบสีทั้งสองแถบนี้เพิ่มมากขึ้นเมื่อเรณูมีพัฒนาการมากขึ้น แถบ c เป็นแถบที่เคลื่อนที่ได้อไกลรองลงมาพบเฉพาะในระยะเรณูมี 2 และ 3 นิวเคลียส แถบ d, e และ f เป็นแถบที่เคลื่อนที่ได้อารองลงมา ตามลำดับ ทั้ง 3 แถบพบในทุกระยะพัฒนาการของเรณู และมีความชัดเจนของแถบสีใกล้เคียงกันในทุกระยะพัฒนาการของเรณู

ข้าวพันธุ์ กข.23 ที่ปลูกในแปลงทดลองนับความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของไอโซไซม์เอสเตอเรสที่ไปยังหัววงได้ 6 แถบ คือ a, b, c, d, e และ f มีค่าสัมประสิทธิ์ของการเคลื่อนที่เท่ากับ 0.65, 0.64, 0.50, 0.45, 0.30 และ 0.27 ตามลำดับ (ภาพที่ 26 B และ ตารางที่ 7) และพบไอโซไซม์เอสเตอเรสที่เคลื่อนที่ไปยังหัววง 1 แถบที่มีความชัดเจนของแถบสีใกล้เคียงกันพบในทุกระยะพัฒนาการของเรณู แถบ a และ b เป็นแถบที่มีการเคลื่อนที่ไปยังหัววง และเคลื่อนที่ไปได้ไกลที่สุดตามลำดับ มีความชัดเจนของแถบสีมากกว่าแถบอื่นๆ และพบว่า ความชัดเจนของแถบสีทั้งสองแถบนี้พบมากในระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียสและเรณูมี 2 และ 3 นิวเคลียส ส่วนแถบ c, e และ f มีความชัดเจนของแถบสีใกล้เคียงกัน

พบในทุกระยะพัฒนาการของเรณู แถบ d พบเฉพาะในระยะเรณูมี 2 และ 3 นิวเคลียส

ข้าวพันธุ์ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM พบว่า มีไซزمแกรมของไอโซไซม์เอสเตอเรสเหมือนกัน นับความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของไอโซไซม์เอสเตอเรสที่ไปยังขั้วบวกได้ 5 แถบคือ a, b, c, d และ e มีค่าสัมประสิทธิ์ของการเคลื่อนที่เท่ากับ 0.49, 0.44, 0.36, 0.33 และ 0.30 ตามลำดับ (ภาพที่ 27 และ ตารางที่ 7) และพบไอโซไซม์เอสเตอเรสที่เคลื่อนที่ไปยังขั้วลบ 1 แถบ เป็นแถบที่มีความชัดเจนของแถบสีใกล้เคียงกัน พบในทุกระยะพัฒนาการของเรณู แถบที่เคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกคือ แถบ a, b และ d เป็นแถบที่เคลื่อนที่ไปได้ไกลที่สุดตามลำดับ มีความชัดเจนของแถบสีเท่ากันในทุกกระยะพัฒนาการ ส่วนแถบ c พบในระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียสและเรณูมี 2 และ 3 นิวเคลียส แถบ e พบเฉพาะในระยะเรณูมี 3 นิวเคลียส

2. การศึกษาไซزمแกรมของเอนไซม์ลิพีนอะมิโนเปปติเดส

ทั้งข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 และ กข.23 ที่ปลูกในแปลงทดลอง นับความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของไอโซไซม์ที่ไปยังขั้วบวกได้ 3 แถบเหมือนกันคือ a, b และ c มีค่าสัมประสิทธิ์ของการเคลื่อนที่เท่ากับ 0.28, 0.20 และ 0.17 ตามลำดับ (ภาพที่ 28 และ ตารางที่ 8) และพบในทุกระยะพัฒนาการของเรณู

ข้าวพันธุ์ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM พบว่า มีไซزمแกรมของเอนไซม์ชนิดนี้เหมือนกัน และมีการเคลื่อนที่ของไอโซไซม์แตกต่างกันไปยังขั้วบวกได้ 3 แถบ คือ a, b และ c ค่าสัมประสิทธิ์ของการเคลื่อนที่ของทั้ง 3 แถบมีค่าเท่ากับ 0.40, 0.31 และ 0.28 ตามลำดับ (ภาพที่ 29 และ ตารางที่ 9) ทั้ง 3 แถบ พบในทุกระยะพัฒนาการของเรณู และพบว่า แถบ a มีความชัดเจนของแถบสีมากกว่าแถบอื่นๆ

3. การศึกษาไซزمแกรมของเอนไซม์อาร์จินีนอะมิโนเปปติเดส

ทั้งข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 และ กข.23 ที่ปลูกในแปลงทดลอง นับความแตกต่าง

ของการเคลื่อนที่ของไอโซไซม์ที่ไปยังข้าววกได้ 3 แถบเหมือนกันคือ a, b และ c มีค่าสัมประสิทธิ์ของการเคลื่อนที่เท่ากับ 0.31, 0.22 และ 0.16 ตามลำดับ (ภาพที่ 30 และ ตารางที่ 8) แถบ a พบในทุกระยะพัฒนาการของเรณูและมีความชัดเจนของแถบสีมากกว่าแถบอื่นๆ แถบ b มีการเคลื่อนที่ได้ไกลรองลงมาพบในทุกระยะพัฒนาการของเรณู ส่วนแถบ c พบเฉพาะในระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส และในระยะเรณูมี 2 และ 3 นิวเคลียส

ข้าวพันธุ์ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือรเคียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM พบว่า มีไซโทแกรมของเอนไซม์ชนิดนี้เหมือนกัน และมีการเคลื่อนที่ของไอโซไซม์แตกต่างกันไปยังข้าววกได้ 3 แถบ คือ a, b และ c ค่าสัมประสิทธิ์ของการเคลื่อนที่ของทั้ง 3 แถบมีค่าเท่ากับ 0.39, 0.30 และ 0.26 ตามลำดับ (ภาพที่ 31 และ ตารางที่ 9) ซึ่งแถบ a และ b พบในทุกระยะพัฒนาการของเรณู และพบว่า แถบ a มีความชัดเจนของแถบสีมากกว่าแถบ b และ c โดยแถบ c พบเฉพาะในระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส และในระยะเรณูมี 2 และ 3 นิวเคลียส

4. การศึกษาไซโทแกรมของเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคสไอโซเมอเรส

ข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 และ กข.23 ที่ปลูกในแปลงทดลองพบว่า มีไซโทแกรมของเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคสไอโซเมอเรสเหมือนกันและมีการเคลื่อนที่ของไอโซไซม์แตกต่างกันไปยังข้าววกได้ 8 แถบคือ a, b, c, d, e, f, g และ h มีค่าสัมประสิทธิ์ของการเคลื่อนที่เท่ากับ 0.28, 0.26, 0.21, 0.20, 0.16, 0.15, 0.12 และ 0.10 ตามลำดับ (ภาพที่ 32 และ ตารางที่ 8) แถบ a, c, d, g และ h พบในทุกระยะพัฒนาการของเรณู แถบ b, e และ f พบเฉพาะในระยะมี 3 นิวเคลียส แถบ a มีความชัดเจนของแถบสีมากกว่าแถบอื่นๆ

ข้าวพันธุ์ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือรเคียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM พบว่า มีไซโทแกรมของเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคสไอโซเมอเรสเหมือนกันหมดทั้ง 3 ความเข้มข้นและมีการเคลื่อนที่ของไอโซไซม์แตกต่างกันไปยังข้าววกได้ 3 แถบ คือ a, b และ c มีค่าสัมประสิทธิ์ของการเคลื่อนที่เท่ากับ 0.29, 0.22 และ 0.12 ตาม

ลำดับ (ภาพที่ 33 และ ตารางที่ 9) พบในทุกระยะพัฒนาการของเรณู

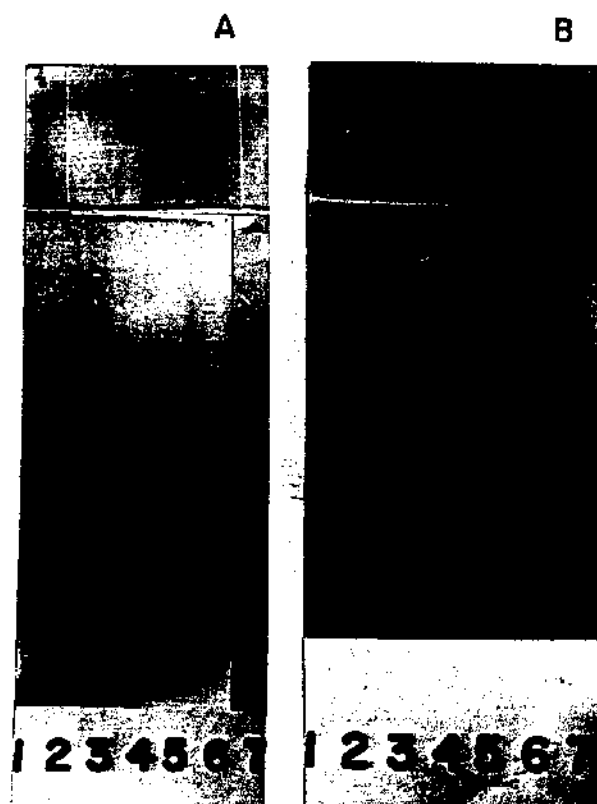
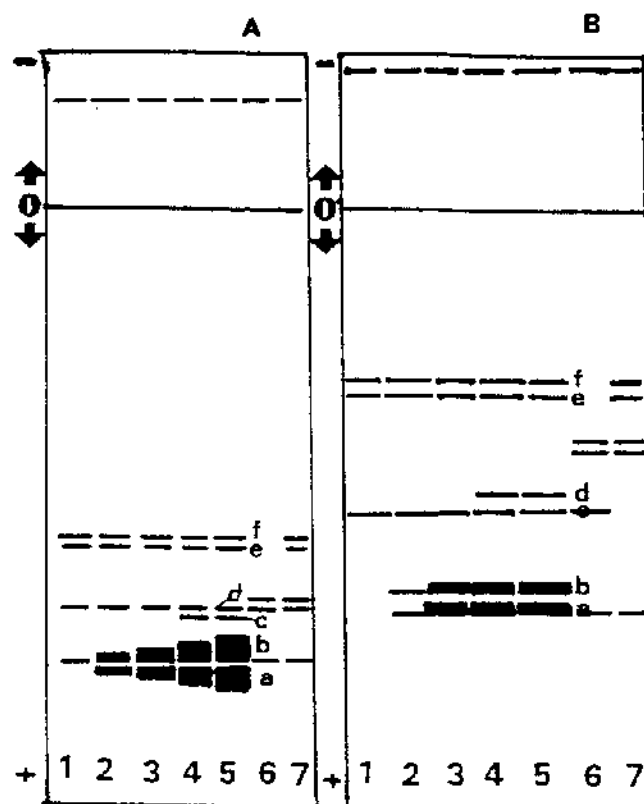
5. การศึกษาไขมันแกรมของเอนไซม์ซิติเมตติไฮโดจีเนส

ข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105, กข.23 ที่ปลูกในแปลงทดลอง และ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM พบว่า ไขมันแกรมของเอนไซม์ซิติเมตติไฮโดจีเนสเหมือนกัน โดยพบว่า ไฮโดรไลม์ชนิดนี้มีรูปแบบเดียวที่มีการเคลื่อนไปยังขั้วบวกและพบในทุกระยะพัฒนาการของเรณู ค่าสัมประสิทธิ์ของการเคลื่อนของไฮโดรไลม์ในข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 และ กข.23 ที่ปลูกในแปลงทดลอง เท่ากับ 0.33 (ภาพที่ 34 และ ตารางที่ 8) และค่าสัมประสิทธิ์ของการเคลื่อนที่ของไฮโดรไลม์ในข้าว กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM มีค่าเท่ากับ 0.28 (ภาพที่ 35 และ ตารางที่ 9)

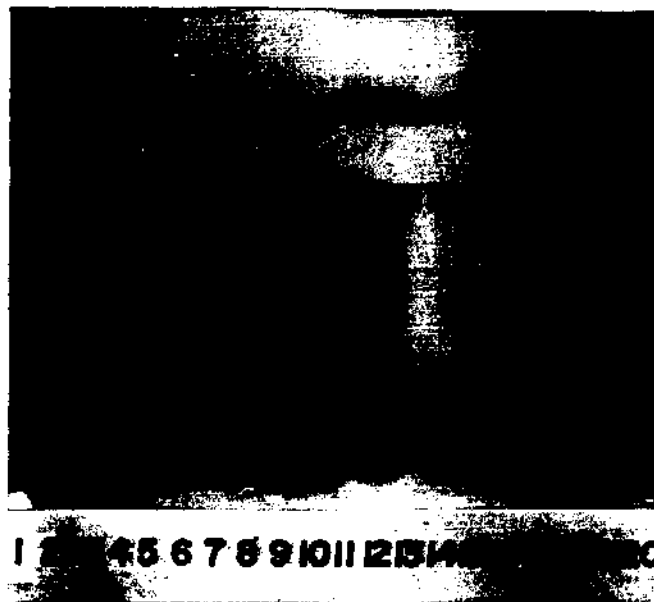
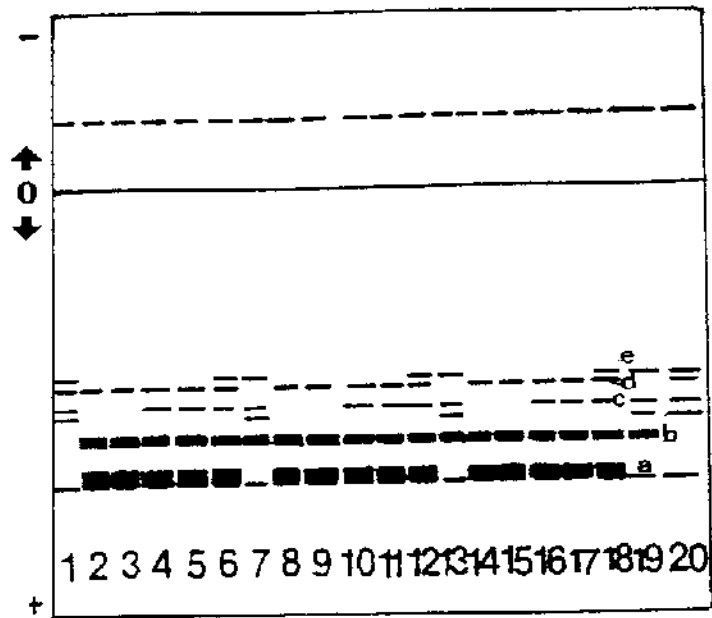
6. การศึกษาไขมันแกรมของเอนไซม์กลูตาเมตออกซาลอะซิเตตทรานสอะมิเนส

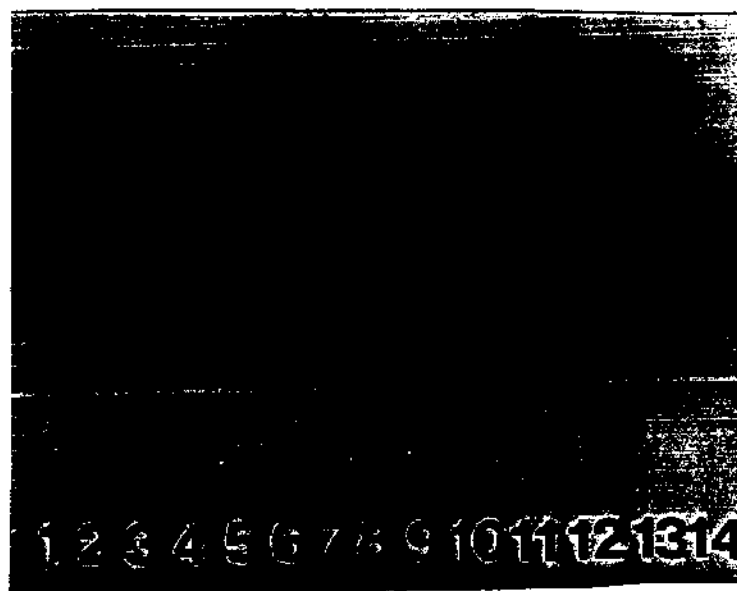
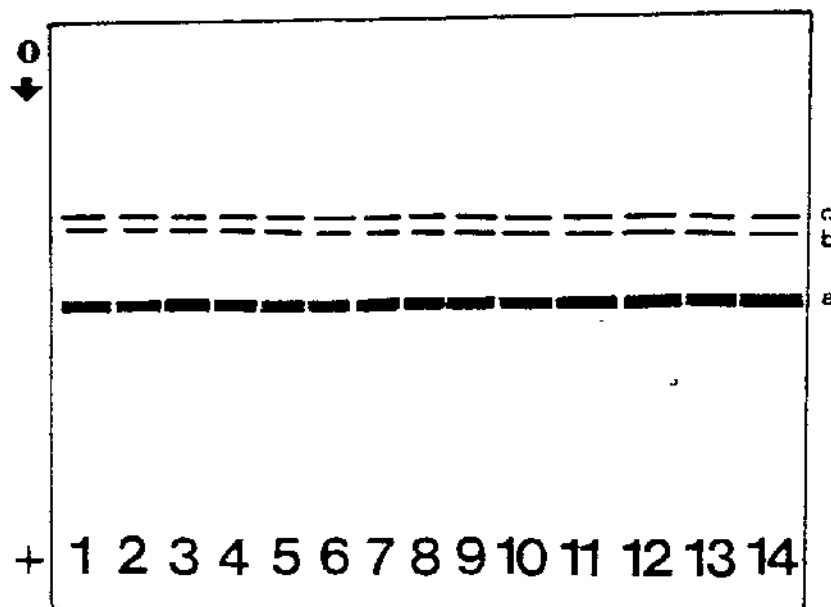
ข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105, กข.23 ที่ปลูกในแปลงทดลอง และ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM พบว่า ไขมันแกรมของเอนไซม์กลูตาเมตออกซาลอะซิเตตทรานสอะมิเนสเหมือนกัน โดยพบไฮโดรไลม์ชนิดนี้มีสองรูปแบบที่มีการเคลื่อนไปยังขั้วบวกและพบในทุกระยะพัฒนาการของเรณู ค่าสัมประสิทธิ์ของการเคลื่อนที่ของไฮโดรไลม์ในข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 และ กข.23 ที่ปลูกในแปลงทดลองเท่ากับ 0.68 (ภาพที่ 36 และ ตารางที่ 8) และค่าสัมประสิทธิ์ของการเคลื่อนที่ของไฮโดรไลม์ใน กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM มีค่าเท่ากับ 0.42 (ภาพที่ 37 และ ตารางที่ 9)

- ภาพที่ 26 ไขมันแกรมของเอนไซม์เอสเตอเรสของอับเรณูที่เรณูระยะต่างๆและของใบแก่
ของข้าว 2 สายพันธุ์คือ ข้าวหอมมะลิ 105 (A) และ กข.23 (B) ที่ปลูกใน
แปลงทดลอง ตัวอย่างที่ใส่แต่ละกลุ่มประมาณ 0.1 กรัม
(0 = จุดเริ่มต้นของตัวอย่าง, + = ทิศทางการวิ่งของตัวอย่างที่ไปยังหัวบวก)
(1) ไมโครสปอร์ไรท์, (2) ไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลลอส,
(3) ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส, (4) เรณูมี 2 นิวเคลียส,
(5) เรณูมี 3 นิวเคลียส, (6) ใบแก่จากต้นระยะช่อดอกโรดพ้นใบธง
(7) ต้นอ่อนอายุ 7 วันของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105



- ภาพที่ 27 ไชโรแกรมของเอนไซม์เอสเตอเรสของอับเรณูที่เรณูระยะต่างๆและของใบแก่ของข้าวพันธุ์ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM ตัวอย่างที่ำขึ้นแต่ละกลุ่มประมาณ 0.1 กรัม (0 = จุดเริ่มต้นของตัวอย่าง, + = ทิศทางการวิ่งของตัวอย่างที่ไปยังหัวบวก)
- (2) - (7) ปลูกในสารละลายธาตุอาหาร 0 mM
- (8) -(13) ปลูกในสารละลายธาตุอาหาร 20 mM
- (14)-(19) ปลูกในสารละลายธาตุอาหาร 40 mM
- (1), (14), (20) ต้นอ่อนอายุ 7 วันของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105
- (2), (8), (14) ไมโครสปอร์ไรโซท์
- (3), (9), (15) ไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลลัส
- (4), (10), (16) ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส
- (5), (11), (17) เรณูมี 2 นิวเคลียส
- (6), (12), (18) เรณูมี 3 นิวเคลียส
- (7), (13), (19) ใบแก่จากต้นระยะช่อดอกโผล่พ้นใบธง





ภาพที่ 28 ไซโรแกรมของเอนไซม์ลิพัสในอะมิโนเปปติเดสของอับเรณูที่เรณูระยะต่างๆ และของใบแก่ของข้าว 2 สายพันธุ์คือ ข้าวหอมมะลิ 105 (2-7) และ กข.23 (8-13) ที่ปลูกในแปลงทดลอง ตัวอย่างที่ใช้แต่ละกลุ่มประมาณ 0.1 กรัม (0 = จุดเริ่มต้นของตัวอย่าง, + = ทิศทางการวิ่งของตัวอย่างที่ไปยังขั้วบวก)

(1) ไมโครสปอร์ไรโซท์, (2) ไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคสโรส,
 (3) ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส, (4) เรณูมี 2 นิวเคลียส,
 (5) เรณูมี 3 นิวเคลียส, (6) ใบแก่จากต้นระยะช่อดอกโผล่พ้นใบธง
 (7) ต้นอ่อนอายุ 7 วันของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105

ภาพที่ 29 ไชโรแกรมของเอนไซม์ลิพอลิเอสของตับของอับเรณูที่เรณูระยะต่างๆ และของใบแก่ของข้าวพันธุ์ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM ตัวอย่างที่ใช้แต่ละกลุ่มประมาณ 0.1 กรัม

(0 = จุดเริ่มต้นของตัวอย่าง, + = ทิศทางการวิ่งของตัวอย่างที่ไปยังหัวบวก)

(2) - (7) ปลูกในสารละลายธาตุอาหาร 0 mM

(8) - (13) ปลูกในสารละลายธาตุอาหาร 20 mM

(14) - (19) ปลูกในสารละลายธาตุอาหาร 40 mM

(1), (14), (20) ต้นอ่อนอายุ 7 วันของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105

(2), (8), (14) ไมโครสปอร์ไรท์

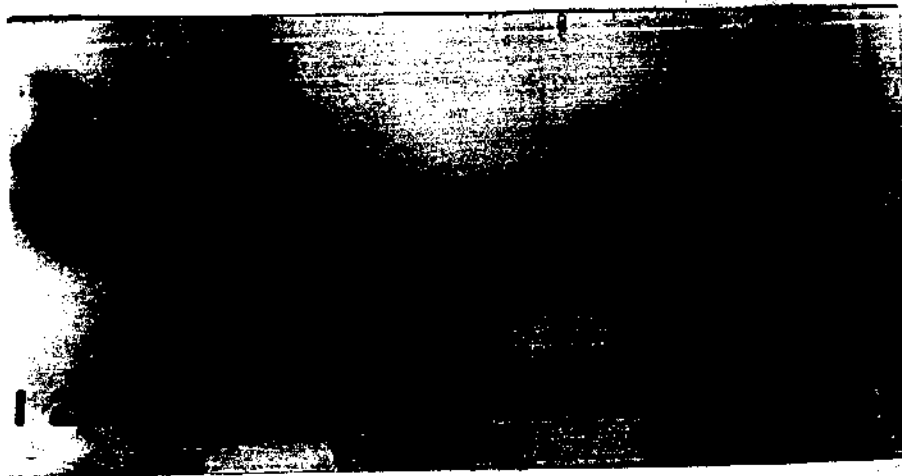
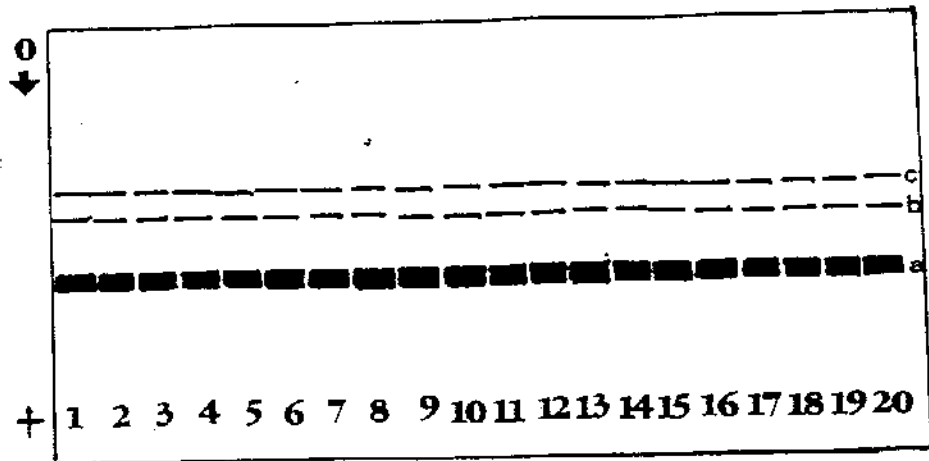
(3), (9), (15) ไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลลัส

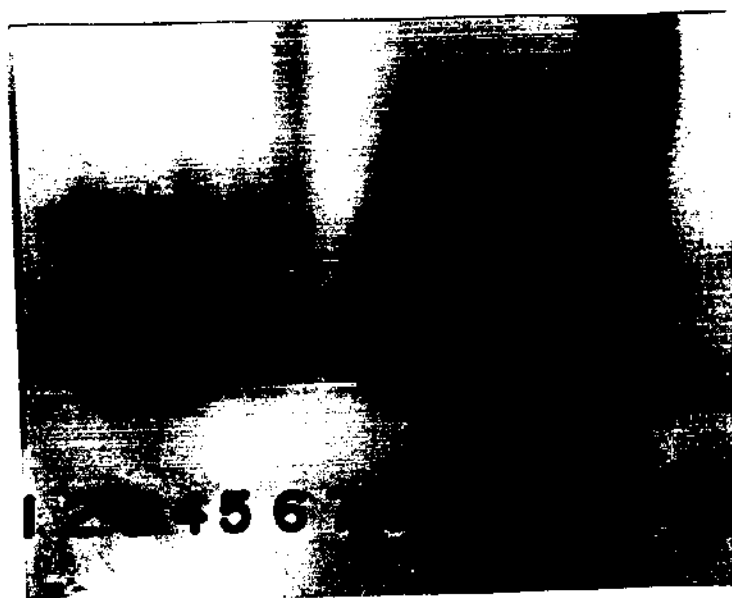
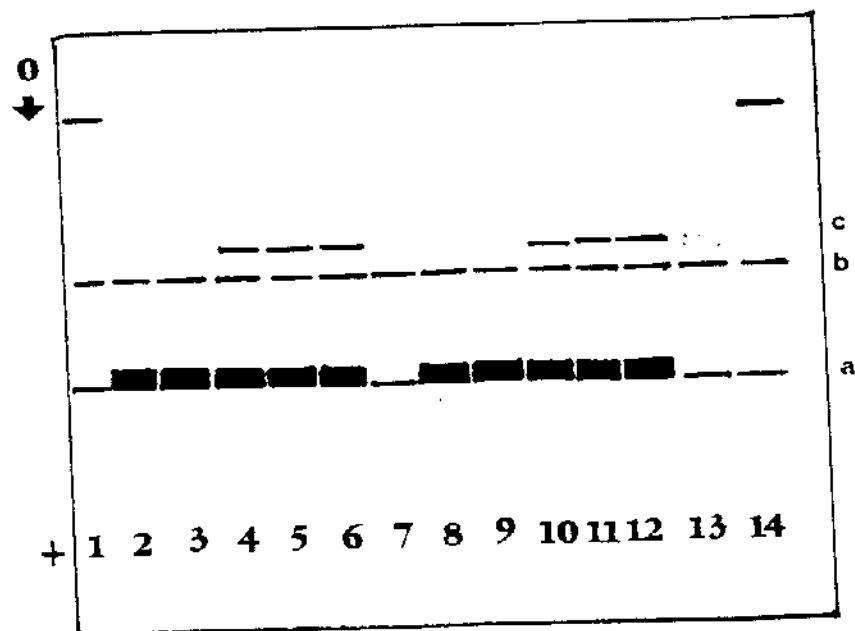
(4), (10), (16) ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส

(5), (11), (17) เรณูมี 2 นิวเคลียส

(6), (12), (18) เรณูมี 3 นิวเคลียส

(7), (13), (19) ใบแก่จากต้นระยะช่อดอกโรปล์พื้นใบธง





ภาพที่ 30 ไซโรแกรมของเอนไซม์อาร์จินีนอะมิโนเบสดีเอสของอับเรอูที่เรอูระยะต่างๆ และของใบแก่ของข้าว 2 สายพันธุ์คือ ข้าวหอมมะลิ 105 (2-7) และ กข.23 (8-13) ที่ปลูกในแปลงทดลอง ตัวอย่างที่ใช้แต่ละกลุ่มประมาณ 0.1 กรัม (0 = จุดเริ่มต้นของตัวอย่าง, + = ทิศทางการวิ่งของตัวอย่างที่ไปยังหัวบวก)

(1) ไมโครสปอร์ไรท์, (2) ไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลโลส,
 (3) ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส, (4) เรอูมี 2 นิวเคลียส,
 (5) เรอูมี 3 นิวเคลียส, (6) ใบแก่จากต้นระยะช่อดอกโผล่พ้นใบธง
 (7) ต้นอ่อนอายุ 7 วันของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105

ภาพที่ 31 ไชโรแกรมของเอนไซม์อาร์จินีนอะมิโนเปปติเดสของอับเรณูที่เรณูระยะต่างๆ และของใบแก่ของข้าวพันธุ์ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM ตัวอย่างที่ใช้แต่ละกลุ่มประมาณ 0.1 กรัม

(0 = จุดเริ่มต้นของตัวอย่าง, + = ทิศทางการวิ่งของตัวอย่างที่ไปยังหัวบวก)

(2) - (7) ปลูกในสารละลายธาตุอาหาร 0 mM

(8) - (13) ปลูกในสารละลายธาตุอาหาร 20 mM

(14) - (19) ปลูกในสารละลายธาตุอาหาร 40 mM

(1), (14), (20) ต้นอ่อนอายุ 7 วันของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105

(2), (8), (14) ไมโครสปอร์ไรโซ

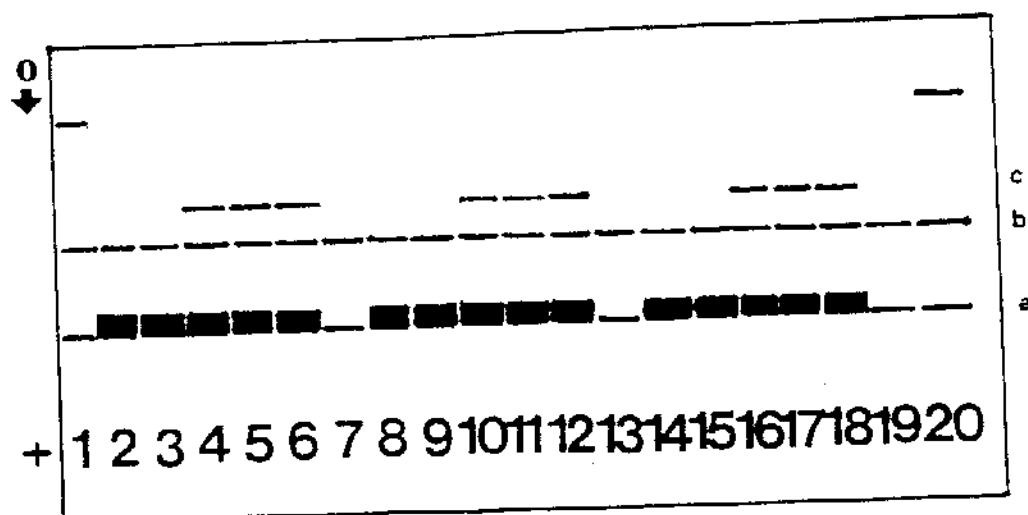
(3), (9), (15) ไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลลัส

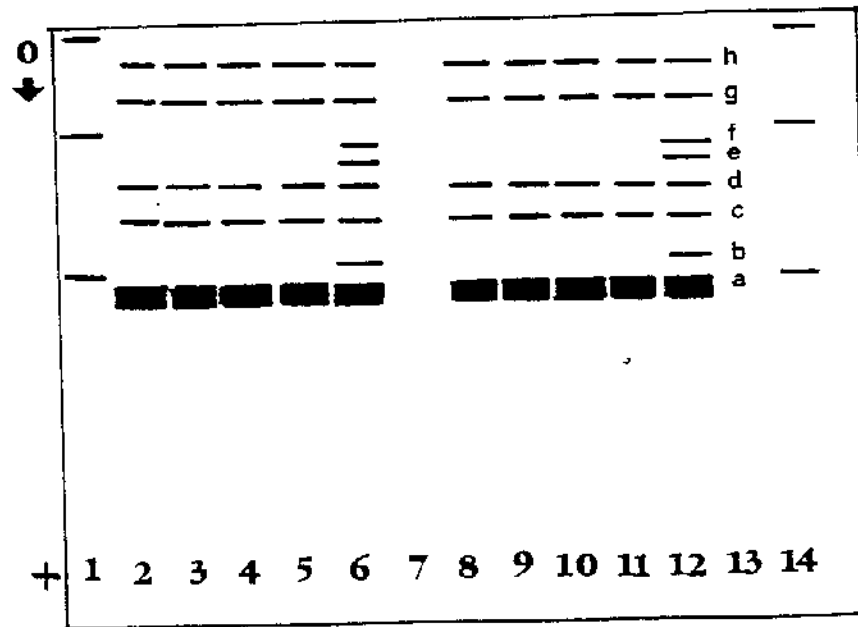
(4), (10), (16) ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส

(5), (11), (17) เรณูมี 2 นิวเคลียส

(6), (12), (18) เรณูมี 3 นิวเคลียส

(7), (13), (19) ใบแก่จากต้นระยะช่อดอกใกล้พ้นใบธง





ภาพที่ 32 โครโมแกรมของเฮนไซม์ฟอสโฟกลูโคสไอโซเมอเรสของอับเรณูที่เรณูระยะต่างๆ และของใบแก่ของข้าว 2 สายพันธุ์คือ ข้าวหอมมะลิ 105 (2-7) และ กข.23 (8-13) ที่ปลูกในแปลงทดลอง ตัวอย่างที่ใช้แต่ละกลุ่มประมาณ 0.1 กรัม (0 = จุดเริ่มต้นของตัวอย่าง, + = ทิศทางการวิ่งของตัวอย่างที่ไปยังหัวบวกล)

(1) ไมโครสปอร์ไรโซท์, (2) ไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลโรส,

(3) ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส, (4) เรณูมี 2 นิวเคลียส,

(5) เรณูมี 3 นิวเคลียส, (6) ใบแก่จากต้นระยะช่อดอกโรยผลพันใบธง

(7) ดินอ่อนอายุ 7 วันของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105

ภาพที่ 33 ไชโรแกรมของเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคสไอโซเมอเรสของอับเรณูที่เรณูระยะต่างๆ และของใบแก่ของข้าวพันธุ์ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM ตัวอย่างที่ใช้แต่ละกลุ่มประมาณ 0.1 กรัม

(0 = จุดเริ่มต้นของตัวอย่าง, + = ทิศทางการวิ่งของตัวอย่างที่ไปยังขั้วบวก)

(2) - (7) ปลูกในสารละลายธาตุอาหาร 0 mM

(8) - (13) ปลูกในสารละลายธาตุอาหาร 20 mM

(14) - (19) ปลูกในสารละลายธาตุอาหาร 40 mM

(1), (14), (20) ต้นอ่อนอายุ 7 วันของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105

(2), (8), (14) ไมโครสปอร์ไรโซท์

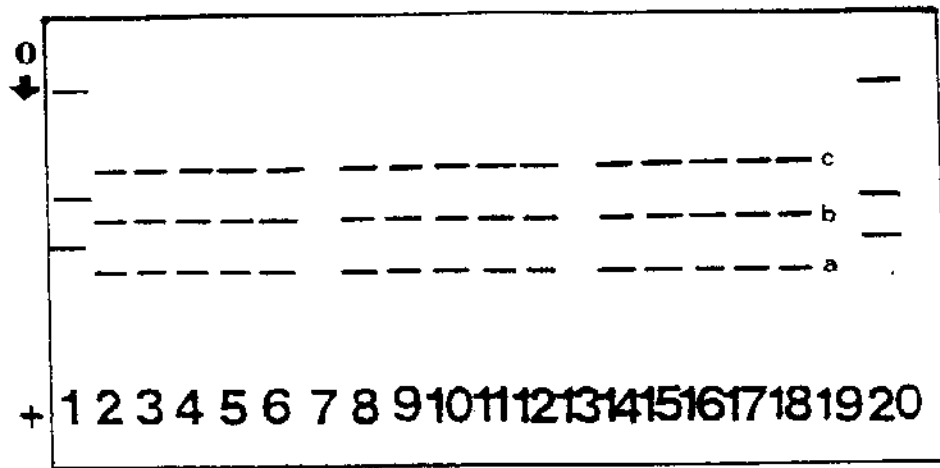
(3), (9), (15) ไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลลัส

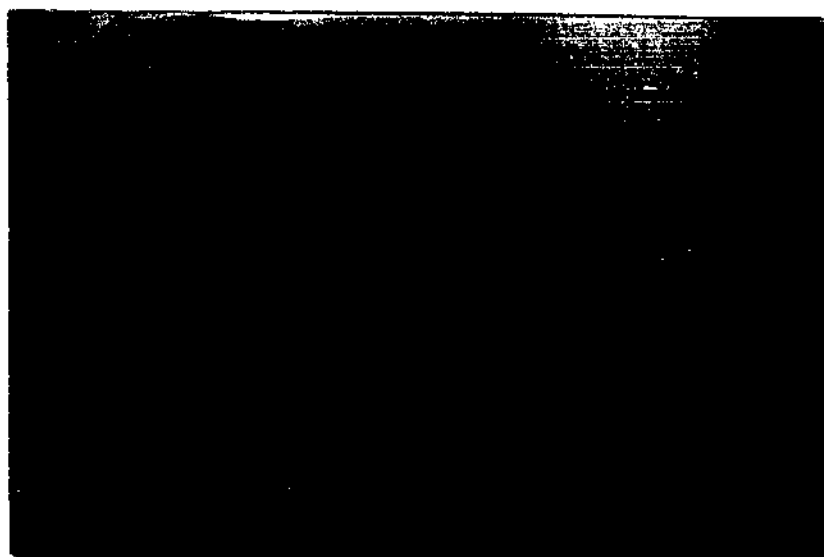
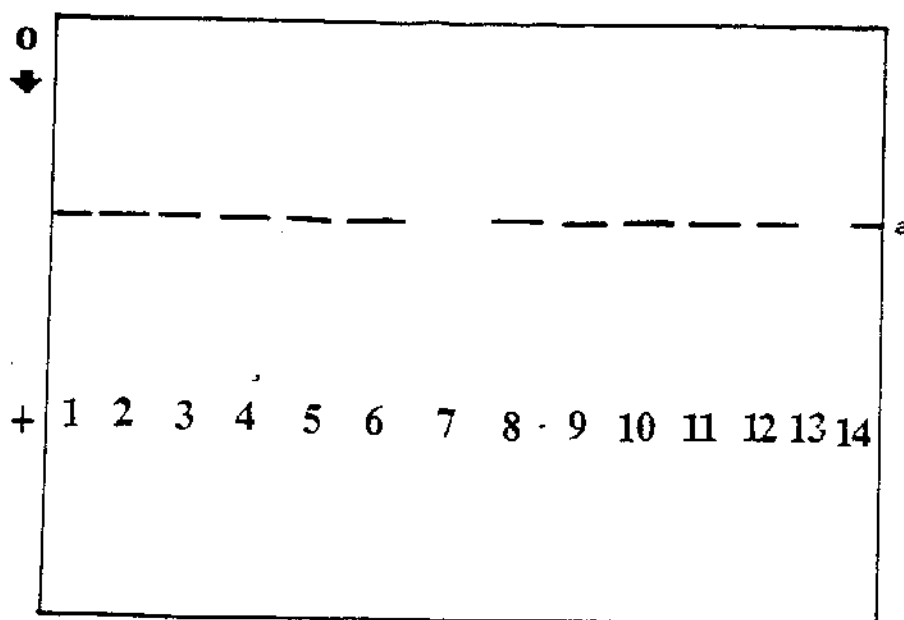
(4), (10), (16) ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส

(5), (11), (17) เรณูมี 2 นิวเคลียส

(6), (12), (18) เรณูมี 3 นิวเคลียส

(7), (13), (19) ใบแก่จากต้นระยะช่อดอกโรลล์พันใบธง





ภาพที่ 34 ไชโรแกรมของเอนไซม์ซิติเมตติไฮโดรจีเนสของอับเรณูที่เรณูระยะต่างๆ และของใบแก่ของข้าว 2 สายพันธุ์คือ ข้าวหอมมะลิ 105 (2-7) และ กข.23 (8-13) ที่ปลูกในแปลงทดลอง ตัวอย่างที่ใส่แต่ละกลุ่มประมาณ 0.1 กรัม (0 = จุดเริ่มต้นของตัวอย่าง, + = ทิศทางการวิ่งของตัวอย่างที่ใบยังขยับวก)
 (1) ไมโครสปอร์ไรท์, (2) ไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลลอส,
 (3) ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส, (4) เรณูมี 2 นิวเคลียส,
 (5) เรณูมี 3 นิวเคลียส, (6) ใบแก่จากต้นระยะช่อดอกโผล่พ้นใบธง
 (7) ต้นอ่อนอายุ 7 วันของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105

ภาพที่ 35 ไขมันแกรมของเอนไซม์ซิติเมตติไฮดรจิเนสของอับเรณูที่เรณูระยะต่างๆและของ
ใบแก่ของข้าวพันธุ์ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีความเข้มข้นของ
เกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM ตัวอย่างที่ชี้แต่
ละกลุ่มประมาณ 0.1 กรัม

(0 = จุดเริ่มต้นของตัวอย่าง, + = ทิศทางการวิ่งของตัวอย่างที่ไปยังหัวบวก)

(2) - (7) ปลูกในสารละลายธาตุอาหาร 0 mM

(8) - (13) ปลูกในสารละลายธาตุอาหาร 20 mM

(14) - (19) ปลูกในสารละลายธาตุอาหาร 40 mM

(1), (14), (20) ต้นอ่อนอายุ 7 วันของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105

(2), (8), (14) ไมโครสปอร์ไรท์

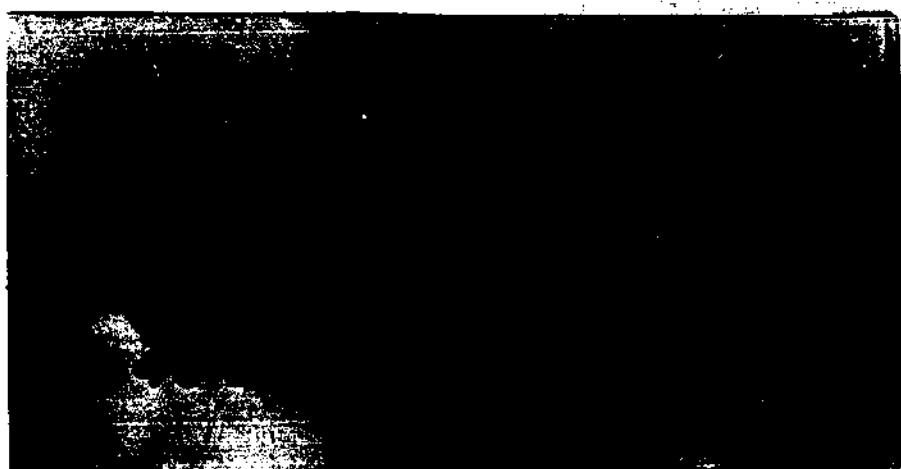
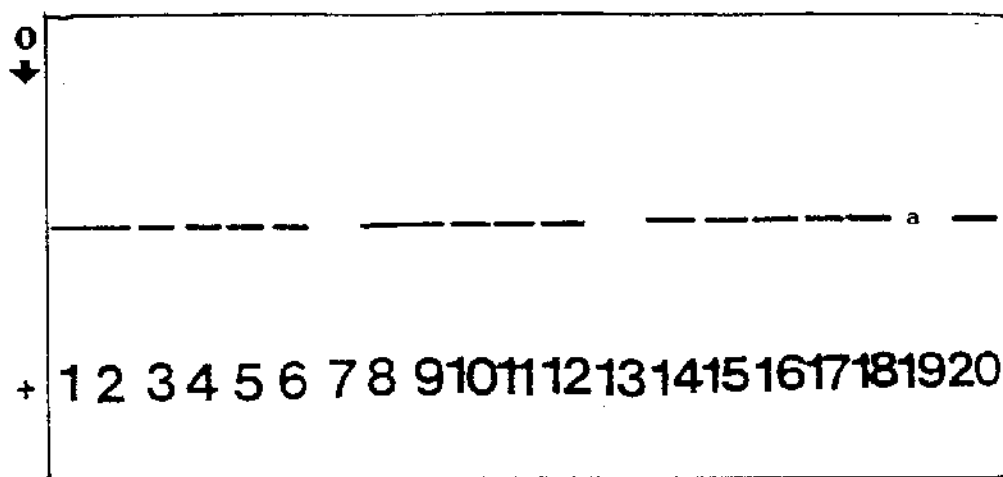
(3), (9), (15) ไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลลอส

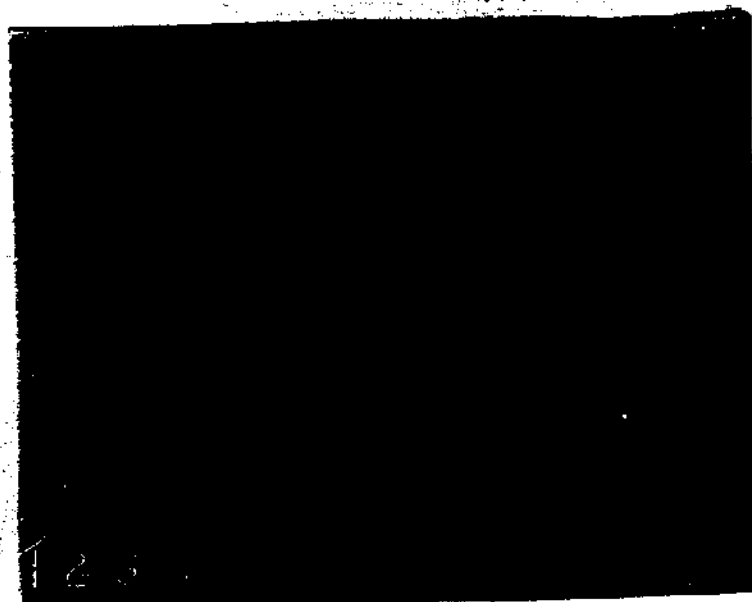
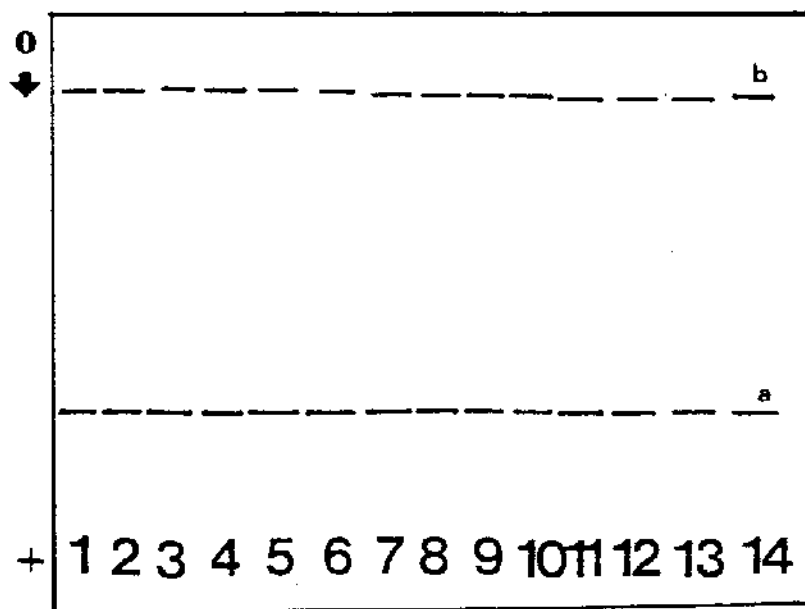
(4), (10), (16) ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส

(5), (11), (17) เรณูมี 2 นิวเคลียส

(6), (12), (18) เรณูมี 3 นิวเคลียส

(7), (13), (19) ใบแก่จากต้นระยะช่อดอกโรสพันธุ์ใบธง





- ภาพที่ 36 ไขมันแกรมของเอนไซม์กลูตาเมตออกซาลอะซิเตตทรานสอะมิเนสของอับเรณูที่เรณู
ระยะต่างๆ และของใบแก่ของข้าว 2 สายพันธุ์คือ ข้าวหอมมะลิ 105 (2-7) และ
กข.23 (8-13) ที่ปลูกในแปลงทดลอง ตัวอย่างที่ใช้แต่ละกลุ่มประมาณ 0.1 กรัม
(0 = จุดเริ่มต้นของตัวอย่าง, + = ทิศทางการวิ่งของตัวอย่างที่ไปยังหัวบวก)
- (1) ไมโครสปอร์ไรโอท์, (2) ไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลลอส,
 - (3) ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส, (4) เรณูมี 2 นิวเคลียส,
 - (5) เรณูมี 3 นิวเคลียส, (6) ใบแก่จากต้นระยะช่อดอกแรกผลัดใบตรง
 - (7) ดันอ่อนอายุ 7 วันของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105

ภาพที่ 37 ไชโรแกรมของเอนไซม์กลูตาเมตออกซาลอะซิเตตทรานสอะมิเนสของยับเเรณที่เรณู
ระยะต่างๆ และของใบแก่ของข้าวพันธุ์ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มี
ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM ตัวอย่าง
ที่แช่แต่ละกลุ่ม ประมาณ 0.1 กรัม

(0 = จุดเริ่มต้นของตัวอย่าง, + = ทิศทางการวิ่งของตัวอย่างที่ไปยังหัวบวก)

(2) - (7) ปลูกในสารละลายธาตุอาหาร 0 mM

(8) - (13) ปลูกในสารละลายธาตุอาหาร 20 mM

(14) - (19) ปลูกในสารละลายธาตุอาหาร 40 mM

(1), (14), (20) ต้นอ่อนอายุ 7 วันของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105

(2), (8), (14) ไมโครสปอร์ไรโซท

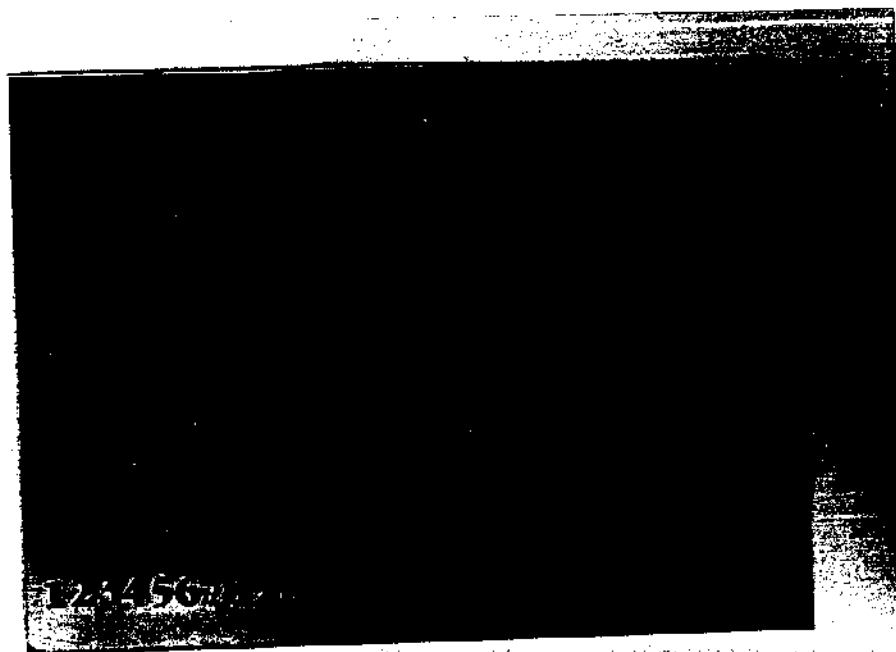
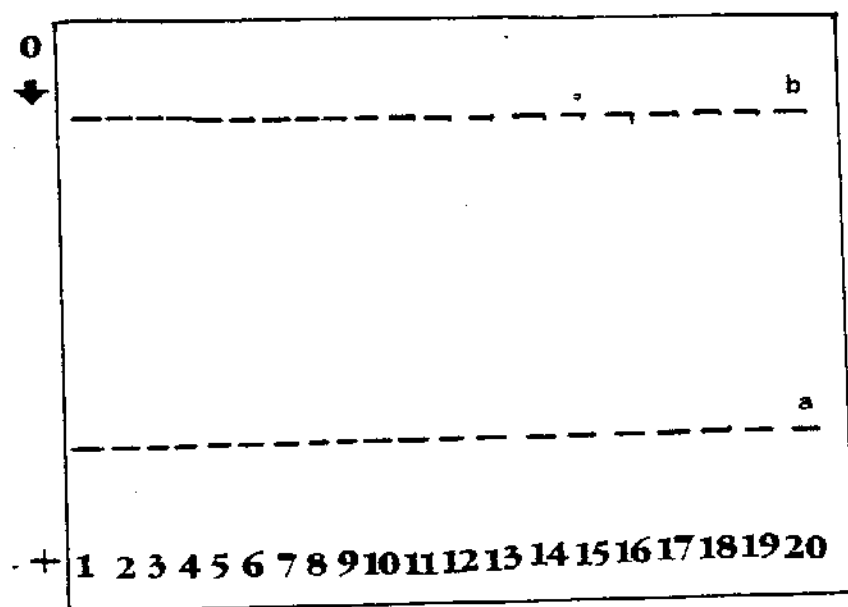
(3), (9), (15) ไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลโรส

(4), (10), (16) ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส

(5), (11), (17) เรณูมี 2 นิวเคลียส

(6), (12), (18) เรณูมี 3 นิวเคลียส

(7), (13), (19) ใบแก่จากต้นระยะช่อดอกโผล่พ้นใบธง



ตารางที่ 8 แสดงสัมประสิทธิ์ของการเคลื่อนที่ของไอโซโทปชนิดต่างๆที่เคลื่อนที่ไปทางซ้ายบวก
ของเรณูในระยะต่างๆ ของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 และ กข.23 ที่ปลูกบนแปลง
ทดลอง (1) ไบโรครสปอร์โรไรท์, (2) ไบโรครสปอร์หลุดจากผนังแคลโลส,
(3) ไบโรครสปอร์มี 1 นิวเคลียส, (4) เรณูมี 2 นิวเคลียส,
(5) เรณูมี 3 นิวเคลียส

[illegible]

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาไขมันแกรมของไวรัสชนิดต่างๆด้วยวิธี สดาร์ช เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ในระหว่างพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105, กข.23 ที่ปลูกในแปลงทดลอง และ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM สรุปผลการศึกษาได้ดังนี้

ทั้งข้าวหอมมะลิ 105 และ กข.23 ที่ปลูกในแปลงทดลอง พบความแตกต่างของไขมันแกรมของเอนไซม์เอสเตอเรส, อาร์จินีนอะมิโนเปปติเดสและฟอสโฟกลูโคสไอโซเมอเรส ในระหว่างพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าว กิจกรรมของไวรัสชนิดที่เกิดขึ้นแตกต่างกันในระหว่างพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าวอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระหว่างพัฒนาการของไมโครสปอร์และเรณูในระยะนั้นๆ และพบความแตกต่างของไวรัสชนิดเอนไซม์เอสเตอเรสในข้าวหอมมะลิ 105 และ กข.23 ที่ปลูกในแปลงทดลองในระยะเรณูมี 2 นิวเคลียสและเรณูมี 3 นิวเคลียส จึงสรุปได้ว่า ข้าวต่างสายพันธุ์กันมีกิจกรรมของไวรัสชนิดเดียวกันในระยะพัฒนาการเดียวกันเกิดขึ้นต่างกัน

ในการศึกษาไขมันแกรมของไวรัสชนิดลิวซีนอะมิโนเปปติเดส, จีดีเมตซีไฮโดรจีเนส, กลูตาเมตออกซาลอะซิเตสทรานสอะมิเนสและฟอสโฟกลูโคสไอโซเมอเรส ไม่พบความแตกต่างของไขมันแกรมในแต่ละระยะพัฒนาการของอับเรณูและละอองเรณูของพันธุ์ข้าวต่างๆ ที่ใช้การศึกษา ดังนั้นไวรัสชนิดต่างๆดังกล่าว จึงไม่สามารถนำมาใช้ในการบ่งชี้ให้เห็นความแตกต่างในแต่ละระยะพัฒนาการของเรณูของข้าวได้

จากการศึกษาของ Thom และ Maretzki (อ้างถึงโดย Peirce และ Brewbaker, 1973) ได้ศึกษาการกระตุ้นและการยับยั้งการทำงานของไวรัสชนิดภายใต้สภาวะที่ทำให้เกิดความเครียดแก่พืช ได้แก่ อุณหภูมิ สารอาหารและความชื้น พบว่า อุณหภูมิ สารอาหาร และความชื้นมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในเนื้อเยื่อ โดยพบว่า ไขมันแกรมของไวรัสชนิดมีการเปลี่ยนแปลงไป แต่จากการศึกษาพบว่า ไขมันแกรมของไวรัสชนิดต่างๆใน

ข้าว กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM ไม่มีความแตกต่างของไขมันแกรมของไอโซไขมันชนิดต่างๆที่ความเข้มข้นต่างๆเลย แสดงได้ว่า ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือที่ 20 และ 40 mM ยังไม่ผลต่อกิจกรรมการทำงานของไอโซไขมันชนิดต่างๆ

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบวิธีการปลูกข้าว กข.23 ในแปลงทดลองและในสารละลาย พบว่าไขมันแกรมของเอนไซม์ที่ได้ทั้งสองวิธีปลูก พบไขมันแกรมของเอนไซม์เอสเตอเรส และ ฟอสโฟกลูโคสไอโซเมอเรสในระหว่างพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าว มีกิจกรรมของไอโซไขมันบางตัวเกิดขึ้นแตกต่างกัน แสดงว่า ความแตกต่างของแหล่งที่ปลูกและวิธีการปลูก อาจมีผลต่อการปรากฏของแถบไอโซไขมันได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม (2532) ที่ศึกษาไอโซไขมันเพอร์ออกซิเดสในต้นอ่อนของยาสูบที่เลี้ยงในดินและในอาหารสังเคราะห์ และรายงานว่ามีไขมันแกรมที่แตกต่างกัน

ผลการศึกษาจะเป็นแนวทางและข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปสู่การศึกษาต่อไปในด้านต่างๆ เช่น อาจนำไปสู่การศึกษานายละเอียดของการเปลี่ยนแปลงรูปแบบไอโซไขมันระหว่างการพัฒนาของอับเรณูและเรณู ทำให้สามารถเข้าใจถึงกลไกพื้นฐานบางอย่างของกระบวนการเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์ได้ หรือ อาจนำไปสู่การศึกษาการแสดงออกของยีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการพัฒนาการของเรณูได้ โดยศึกษาจากการเปลี่ยนแปลงในรูปแบบของไอโซไขมันได้ เป็นต้น