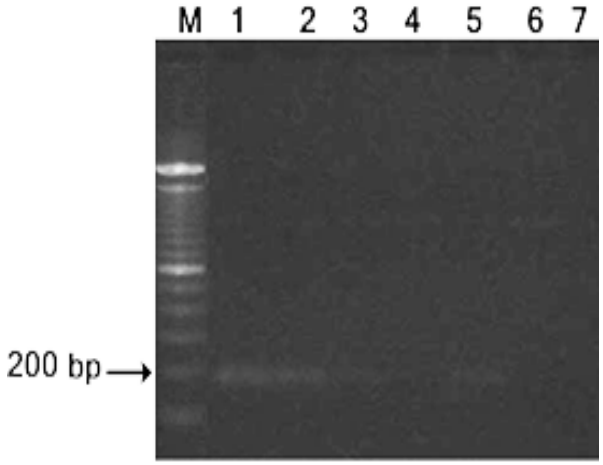
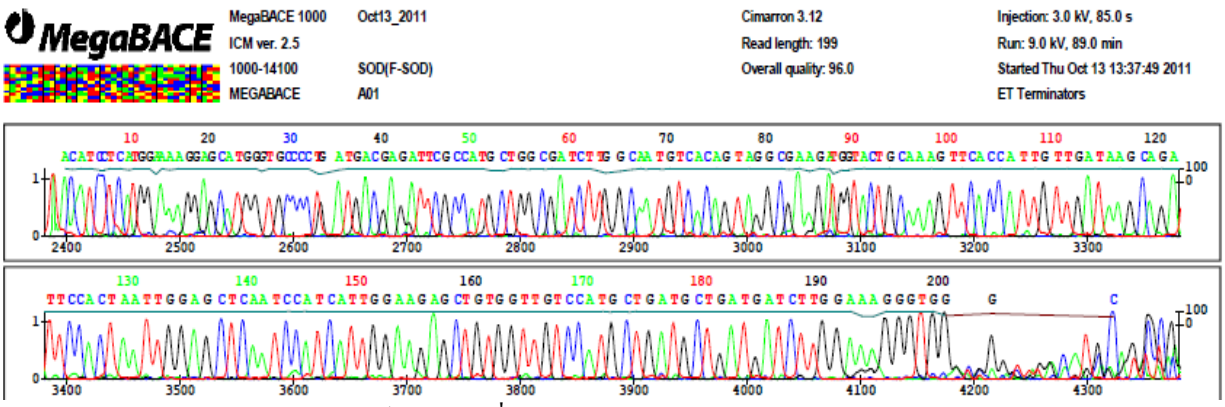
จากผลการทำ RT-PCR แสดงว่า การแสดงออกของยีน Cu,Zn-SOD มีระดับใกล้เคียงกันในตาข้างระยะที่ 1 และ ระยะที่ 2 แล้วลดลงในช่วงเกิดการกระตุ้นการเจริญของตาข้างระยะที่ 3 ถึง ระยะที่ 4 กลับเพิ่มสูงขึ้นในระยะที่ 5 แล้วลดลงอีกในระยะที่ 6 การเปลี่ยนแปลงมีแนวโน้มไม่สัมพันธ์กับการเปลี่ยนระยะการเจริญของตาข้างในช่วงเกิดการงอก



ภาพที่ 14 ผลการทำ RT-PCR ของ Cu, Zn-SOD จากตาข้างที่หัวเยรูซาเล็มอาร์ติโชกทั้ง 6 ระยะ
(cDNA 200 นาโนกรัม PCR 25 cycles)
M: 100 bP DNA ladder marker
ตัวเลขกำกับ 1-6 แทนระยะการเจริญทั้ง 6 ระยะ ตามลำดับ
7: negative control



Query หมายถึง ลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่ได้จากการทดลอง

Sbjct หมายถึง ลำดับอ้างอิง ในที่นี้คือ ลำดับเบสของ Cu,Zn-SOD ของ *Helianthus annus*

➢ AJ786258.1 Helianthus annuus mRNA for Cu, Zn superoxide dismutase, (sod2 gene)

Score = 350 bits (189), Expect = 2e-93

Identities = 195/198 (98%), Gaps = 0/198 (0%)

Strand=Plus/Plus

Query 3 ATCCTCATGGAAAGGAGCATGGTGCCCCTGATGACGAGATTCGCCATGCTGGCGATCTTG 62

Sbjct 280 ATCCTCATGGAAAGGAGCATGGTGCCCCTGATGACGAGATTCGCCATGCTGGCGATCTTG 339

Query 63 GCAATGTCACAGTAGGCGAAGATGGTACTGCAAAGTTCACCATTGTTGATAAGCAGATTC 122

Sbjct 340 GCAATGTCACAGTAGGCGAAGATGGTACTGCAAAGTTCACCATTGTTGATAAGCAGATTC 399

Query 123 CACTAATTGGAGCTCAATCCATCATTGGAAGAGCTGTGGTTGTCCATGCTGATGCTGATG 182

Sbjct 400 CACTAATTGGAGGTCAATCCATCATTGGAAGAGCTGTGGTTGTCCATGCTGATCCTGATG 459

Query 183 ATCTTGGAAAGGGTGGGC 200

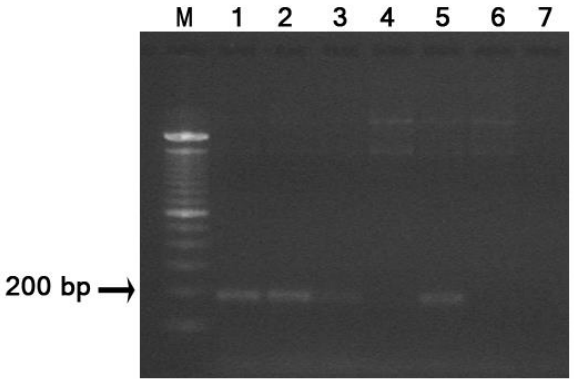
Sbjct 460 ATCTTGGAAAGGGAGGGC 477

ภาพที่ 15 ผลการลำดับเบสและการวิเคราะห์ด้วย Nucleotide Blast ของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของการวิเคราะห์การแสดงออกของ Cu,Zn-SOD จากตาข้างระยะที่ 1 ของหัวแก่นตะวัน

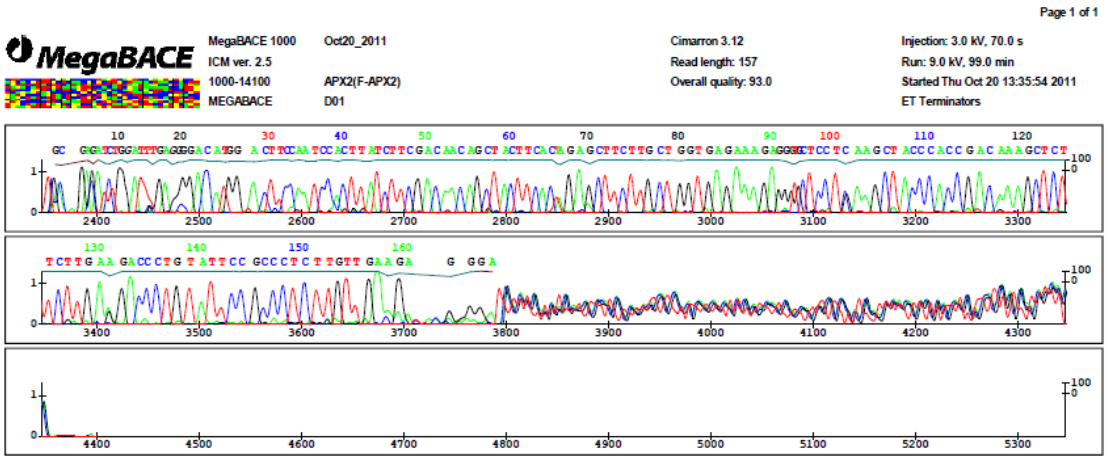
การออกแบบไพรเมอร์สำหรับงาน RT-PCR ของเอนไซม์แอสคอร์เบตเปอร์ออกซิเดส (APX) อาศัยข้อมูลยีน *APX* ของ *Arachis hypogaea* (accession no. DQ097722.1) เป็นต้นแบบในการใช้ออกแบบไพรเมอร์ในครั้งนี้จากฐานข้อมูล GenBank ในขั้นตอนแรกของการออกแบบไพรเมอร์เริ่มจากการหาบริเวณช่วงลำดับเบสอนุรักษ์ (conserved sequences) กันระหว่างพืชชนิดอื่นอีก 8 ตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม ClustalW ได้ไพร-เมอร์ ซึ่งคาดคะเนว่าจะเกิดปฏิกิริยา PCR กับบริเวณเป้าหมายได้ผลิตภัณฑ์จำเพาะขนาด 183 bp

ผลการทำ RT-PCR ของ Ascorbate peroxidase (APX) ที่ตาข้างของหัวเยรูซาเล็มอาร์ติโชกทั้ง 6 ระยะ

จากการทำ RT-PCR ของ *APX* จากตาข้างหัวเยรูซาเล็มอาร์ติโชกทั้ง 6 ระยะ ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบ โดยใช้อุณหภูมิช้ annealing ที่ 60 องศาเซลเซียส เมื่อตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis พบผลิตภัณฑ์แถบเดี่ยวตามขนาดที่คาดคะเนไว้ที่ 183 bp (ภาพที่ 16) เมื่อนำไปยืนยันด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่าเป็นลำดับของเอนไซม์ APX (ภาพที่ 17) การแสดงออกของ APX สัมพันธ์กับการแสดงออกของ Cu,Zn-SOD ซึ่งสอดคล้องกับหน้าที่ตามธรรมชาติของเอนไซม์สองชนิดนี้ ซึ่ง APX ทำหน้าที่รับช่วงจาก Cu,Zn-SOD ที่ผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ส่วน APX สลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อให้กลายสภาพเป็นน้ำและออกซิเจน



ภาพที่ 16 ผลการทำ RT-PCR ของ APX จากตาข้างที่หัวเยรูซาเล็มอาร์ติโชกทั้ง 6 ระยะ
(cDNA 200 นาโนกรัม, PCR 25 cycles)
M: 100 bP DNA ladder marker
ตัวเลข 1-6 แทนระยะการเจริญของตาข้าง 1-6 ระยะ ตามลำดับ
7: negative control



Query หมายถึง ลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่ได้จากการทดลอง

Sbjct หมายถึง ลำดับอ้างอิง ในที่นี้คือ ลำดับเบสของ Tragopogon porrifolius ascorbate peroxidase 2-like protein

Score = 163 bits (180), Expect = 3e-37

Identities = 130/154 (84%), Gaps = 2/154 (1%)

Strand=Plus/Plus

Query 4 AGATCTGGATTTGAGGGGACATGGACTTCCAATCCACTTATCTTCGACAACAGCTACTTC 63

Sbjct 125 AGATCTGGATTTGAAGGACCATGGACCCCAAATCCTCTTATCTTTGACAACAGCTACTTC 184

Query 64 ACTAGAGCTTCTTGCTGGTGAGAAAGAGGGTGCTCCTCAAGCTACCCACCGACAAAGCTC 123

Sbjct 185 AC-AGAATTGCTTGCTGGTGAGAAGGAAGG-GCTTTTGAAGCTACCTACGGACAAGGCTC 242

Query 124 TTCTTGAAGACCCTGTATTCCGCCCTCTTGTTGA 157

Sbjct 243 TTCTTGAAGACCCTGTATTCCGACCTTTGGTTGA 276

ภาพที่ 17 ผลการลำดับเบสและการวิเคราะห์ด้วย Nucleotide Blast ของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของการวิเคราะห์ การแสดงออกของแอสคอร์เบตเปอร์ออกซิเดส (APX) จากตาข้างระยะที่ 1 ของหัวแก่นตะวัน

5. อภิปรายผลการวิจัย

เลกตินเป็นโปรตีนที่มีบริเวณจับอย่างจำเพาะสำหรับน้ำตาล (sugar binding site) (Sharon and Lis 1972) เลกตินแบ่งเป็นกลุ่มตามความจำเพาะต่อน้ำตาล ได้แก่ เลกตินที่จำเพาะต่อกลูโคส/ แมนโนส (mannose) เลกตินที่จำเพาะต่อกาแลคโตส (galactose)/ อะเซทิลกาแลคโตซามีน (N-acetylgalactosamine) เป็นต้น พบเลกตินทั้งในพืชและสัตว์ ในพืชนั้นมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการควบคุมการงอกของเมล็ด การจดจำกัน (recognition) ระหว่างละอองเกสรตัวผู้กับไข่เพื่อให้เกิดการปฏิสนธิ และกระตุ้นการแบ่งเซลล์ของพืช เป็นต้น พบเลกตินได้ในเซลล์ของราก ลำต้น ใบ ในเซลล์ของเนื้อเยื่อสืบพันธุ์ ในส่วนเนื้อเยื่อเก็บสะสมอาหาร (Borrebaeck 1984) ปัจจุบันยังพบว่าเลกตินทำหน้าที่ป้องกันกลไกการรุกรานจากไวรัส จุลินทรีย์ และแมลง (Vandenborre et al. 2011) ส่วนใหญ่เลกตินสะสมอยู่มากที่ใบเลี้ยงในระยะที่เป็นเอนโดสเปิร์ม (endosperm) ของเมล็ด และคาดว่าเป็นแหล่งสำรองที่พืชจะใช้ในการเจริญเติบโต มีหลักฐานว่าปริมาณของเลกตินลดลงเมื่อเมล็ดเริ่มงอก อย่างไรก็ตาม ด้วยข้อมูลนี้ยังสรุปไม่ได้ว่า เลกตินทำหน้าที่เป็นโปรตีนสำรองเพียงอย่างเดียว มีรายงานที่น่าสนใจว่า เลกตินยังสามารถจับยึดกับฮอร์โมนพืชไซโตไคนิน (cytokinin) โดยใช้บริเวณไฮโดรโฟบิกของโมเลกุล (Roberts and Goldstein 1983) ความรู้เกี่ยวกับเลกตินส่วนใหญ่ได้มาจากการศึกษากับเลกตินที่เอนโดสเปิร์มของเมล็ด ส่วนเลกตินที่เนื้อเยื่อทั่วไป (vegetative tissues) ยังมีการศึกษากันน้อยมาก (อ้างใน Esteban et al. 2002) การเข้าใจถึงหน้าที่ของเลกตินจำเป็นต้องได้ข้อมูลจากพืชหลายชนิด โดยต้องศึกษาเลกตินในเนื่อเยื่อหลายส่วนและที่ช่วงชีวิตต่างๆ กัน Van Damme et al. (2004) รวบรวมการค้นพบเลกตินอยู่ในไซโตพลาสซึมและนิวเคลียส

ตาที่หัวแก่นตะวัน (เยรูซาเล็มอาร์ติโชก) เป็นเนื้อเยื่อเจริญที่พักตัว เพราะหัวแแก่นตะวันเป็นส่วนของลำต้นใต้ดินซึ่งเปลี่ยนพัฒนาการเป็นเนื้อเยื่อไม่เจริญแต่เก็บสะสมอาหาร พรพิมล เจียระนัยปรีเปรมและคณะ (2554) รายงานพบการลดลงของปริมาณโปรตีนเลกติน2 (lectin2) ในขณะที่ตาข้าง (lateral bud) กำลังเริ่มงอก Esteban et al. (2002) รายงานผลในทำนองคล้ายกันนี้ในการทดลองกับต้นอ่อน (seedling) ของถั่วชนิดหนึ่ง (chickpea) ซึ่งปริมาณเลกตินชนิดหนึ่งในอิพิโคทิล (epicotyl) ลดลงขณะเจริญเติบโต

ในการวิจัยนี้ ใช้วิธีการสกัดโปรตีนแยกส่วนเซลล์ (Hood et al. 1988) เพื่อหาตำแหน่งของเลกติน2 ในเซลล์ตาข้าง พบอยู่เฉพาะที่ผนังเซลล์ ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน อย่างไรก็ตาม รายงานผลการวิจัยโดย Hoson and Masuda (1987) ให้ผลกระทบของเลกตินจากภายนอกต่อการยืดตัวของยอดต้นอ่อนในข้าวและถั่ว พบว่า เลกตินนี้เข้าไปเกาะอยู่กับผนังเซลล์ซึ่งเป็นแหล่งใหญ่ของน้ำตาลชนิดต่างๆ เมื่อผู้วิจัยให้

ผลกระทบซ้ำด้วยฮอร์โมนออกซิน (auxin) ปรากฏว่า ยอดพืชไม่เกิดการเจริญ โดยปกติออกซินออกฤทธิ์กระตุ้นการยืดตัวของต้นอ่อน ด้วยการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของเอนไซม์ ที่คลายความแข็งแรงในโครงสร้างผนังเซลล์ สรุปว่า เลกตินถ้าอยู่ที่ผนังเซลล์จะต้านการออกฤทธิ์ของออกซิน จึงมีเหตุผลที่ระดับเลกตินจะต้องถูกควบคุมให้ลดลงเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของยอดอ่อน อีกเหตุหนึ่งซึ่งอาจใช้อธิบายได้ คือ เนื้อเยื่อเจริญ (meristem) ของทั้งตายอด ตาข้าง และคัพภะ (embryo) มีลักษณะเหมือนกันคือเซลล์จะเบียดกันชิดแน่น (tight adherence) เมื่อเซลล์เกิดพัฒนาการ (differentiation) จึงค่อยออกห่างจากการกัน (Knox 1992) เหตุผลนี้สอดคล้องกับคุณลักษณะของเลกตินซึ่งส่งเสริมการอยู่ชิดติดกันของเซลล์ (Sharon and Lis 1972) ประการสุดท้าย การเจริญเติบโตของตาที่หัวแก่นตะวัน (เยรูซาเล็มอาร์ติโชก) ต้องการการออกฤทธิ์ที่เหมาะสมของทั้งออกซินและไซโตไคนินเช่นเดียวกับเนื้อเยื่อเจริญอื่น (Kamisaka and Masuda 1971; Palmer and Gunnings 1984) การที่เลกตินอาจต่อต้านฤทธิ์ของออกซิน (Hoson and Masuda 1987) หรือ อาจจับไคเนตินไว้ (Roberts and Goldstein 1983) สามารถเป็นเหตุผลที่เกี่ยวข้องกับการพักตัวของเนื้อเยื่อเจริญ และพืชต้องมีกลไกการลดปริมาณเลกตินในสภาวะที่เซลล์จะเริ่มเกิดการเจริญได้

Van Damme et al. (1999) รายงานโปรตีนเลกติน 2 ชนิด ซึ่งพบที่หัวเยรูซาเล็ม อาร์ติโชค (แก่นตะวัน) คือ lectin 1 และ lectin 2 (หรือเรียกอีกอย่างว่า lectin HE17 และ tuber agglutinin) ในขณะที่ Suseelan et al. (2002) รายงานเลกติน HTTL ในหัวแก่นตะวัน โปรตีนเลกตินอีกชนิดหนึ่งที่พบในเยรูซาเล็ม อาร์ติโชค (แก่นตะวัน) คือ เลกติน HTAI และ HTAII ในแคลลัส (callus) ซึ่งจะมีการแสดงออกเฉพาะเมื่อเหนี่ยวนำแคลลัสด้วยกรดจาสโมนิก (jasmonic acid) (Nakagawa et al. 2003) เลกตินเหล่านี้มีลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนและลำดับเบสของรหัสพันธุกรรมใกล้เคียงกันมาก แต่เนื่องจากคณะผู้วิจัยสามารถตรวจพบได้ว่าเป็นเลกติน2 ที่อยู่กับเนื้อเยื่อตาข้างหัวแก่นตะวัน และลดปริมาณลงเมื่อตาข้างเกิดการงอก จึงมุ่งศึกษาการแสดงออกที่ระดับยีนของเลกติน2 ด้วยวิธี RT-PCR จากการทดสอบไพรเม อร์ที่จะใช้ใ นขั้นตอน PCR โดยกำหนดสภาวะพื้นฐานของปฏิกิริยา PCR ที่ช่วยเพิ่มความจำเพาะของไพรเมอร์บริเวณเป้าหมาย ได้แก่ สภาวะซึ่งลดโอกาสการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบส ปรากฏ ว่า ได้คู่ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ คู่เดิมที่ Nakagawa et al. (2003) รายงานไว้ คือ F-R1 และคู่ที่ออกแบบ Reverse primer ใหม่ (R3) ใช้คู่กับ Forward primer (F) เดิมของ Nakagawa et al. (2003) บริเวณของ R3 อยู่เหนือ (upstream) ลำดับของ R1 เล็กน้อย จากการทำ alignment ลำดับเบสของ R1 ในเลกตินหลายๆ ชนิดของหัวแก่นตะวัน (สุพรนุชดำรงค์ และคณะ 2555) พบว่ามีความเหมือนกันสมบูรณ์ ดังนั้น การทำ RT-PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ F-R1 จึงไม่มีความจำเพาะต่อเลกติน2 เท่านั้น อาจเป็นไปได้ว่าจะเป็นโปรตีนเลกตินชนิดใดใดที่มีในตาข้าง ที่น่า

สังเกตคือ จะเกิดผลิตภัณฑ์อีกหนึ่งขนาดควบคู่ตลอดเวลา ในระดับที่มีปริมาณแปรปรวนผกผันกับปริมาณของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของเลกติน2 ไพรเมอร์ F-R1 น่าจะมีความจำเพาะใกล้เคียงกันต่อลำดับต้นแบบ (template) ทั้งสองบริเวณ ส่วนคู่ไพรเมอร์ F-R3 ซึ่งออกแบบดัดแปลงให้มีความจำเพาะต่อลำดับเบสช่วงหนึ่งของ *lectin2* cDNA เมื่อใช้ทำ RT-PCR ให้ผลการทดลองซึ่งแสดงว่า การแสดงออกของยีน *lectin2* ลดลงอย่างต่อเนื่องชัดเจนเมื่อตาข้างของหัวแก่นตะวันถูกกระตุ้นให้เกิดการเจริญ ในขณะที่ยีน 18S rRNA เกิดการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อตาข้างเกิดการเจริญ บ่งชี้ว่าเซลล์เกิดกิจกรรมสังเคราะห์โปรตีนเพิ่มขึ้น ทั้งนี้ 18S rRNA เป็นส่วนประกอบของไรโบโซมหน่วยเล็ก (small subunit ribosome) ไรโบโซมเป็นชีวโมเลกุลโปรตีนเชิงซ้อน ทำหน้าที่ในกระบวนแปลรหัสพันธุกรรม (translation) ให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน การที่ SDS-PAGE วิเคราะห์แถบของโปรตีนเลกติน2 ได้ว่ามีปริมาณลดลง (พรพิมล เจียระนัยปรีเปรมและคณะ 2554) อย่างน้อยน่าจะเป็นผลจาก 2 สาเหตุร่วมกัน คือ การแสดงออกของยีน *lectin2* ลดลง และเกิดการแสดงออกของโปรตีนชนิดอื่นๆ เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของเซลล์ของตาข้าง

ในระยะพักตัว (dormancy) เซลล์มีกิจกรรมเมตาบอลิซึมต่ำ เป็นวิวัฒนาการการปรับตัวของพืชเพื่อความอยู่รอดตามธรรมชาติในสภาวะที่สิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสมเกิดจากเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีภายในเซลล์และเนื้อเยื่อซึ่งควบคุมโดยฮอร์โมน ทำให้เซลล์อยู่ที่ระยะ G1-phase (Suttle 2004) พืชบางชนิดเกิดภาวะพักตัวของเนื้อเยื่อส่วนใดส่วนหนึ่งแล้วยังคงอยู่ในภาวะนั้นจนแม้เมื่อสิ่งแวดล้อมเหมาะสมแล้วก็ยังไม่เจริญเติบ โต พืชเศรษฐกิจชนิดที่มีภาวะพักตัวและได้รับการศึกษาอย่างมาก คือ มันฝรั่ง เพื่อให้รู้สภาวะที่จะทำให้หัวมันฝรั่งอยู่ในระยะพักตัวให้นานขึ้น ฮอร์โมนเอทิลีน (ethylene) และกรดแอบซิสสิก (abscisic acid; ABA) ชักนำภาวะพักตัว ฮอร์โมนABA คงสภาพภาวะพักตัว ฮอร์โมนไซโตไคนินชักนำการออกจากภาวะพักตัว (dormancy breakage) ส่วนออกซินและจิบเบอริลิน (gibberrellins) กระตุ้นการเกิดยอดอ่อนของตาที่หัวมันฝรั่ง (sprouting) เมื่อจะออกจากภาวะพักตัวเซลล์ย่อมมีกิจกรรมเมตาบอลิซึมสูงขึ้น รวมทั้งกิจกรรมการหายใจที่ไมโตคอนเดรีย ผลที่ตามมาคือภายในเซลล์เริ่มเกิดกลุ่มสารออกซิเจนว่องไว (reactive oxygen species; ROS) ในไซโตพลาสซึม เปอร์ออกซิโซม (peroxisome) และไมโตคอนเดรีย (Møller 2001; Karuppanapandian et al. 2011) อนุมูลอิสระออกซิเจนที่เรียกว่าซุปเปอร์ออกไซด์ (superoxide free radical) เป็น ROS ตัวเริ่มต้น แหล่งที่ผลิตซุปเปอร์ออกไซด์อีกเช่นกัน คือ กระบวนการสังเคราะห์แสงในคลอโร-พลาสต์ แต่ในงานวิจัยนี้กระตุ้นตาข้างของหัวแก่นตะวันถึงระยะก่อนเกิดยอดอ่อน กระบวนการสังเคราะห์แสงจึงเป็นปัจจัยไม่เกี่ยวข้องกับการทดลอง

เซลล์พืชมีระบบจัดการ ROS ซึ่งเกิดขึ้นในเซลล์ทั้งในระดับปกติจากเมตาบอลิซึมพื้นฐาน (basal metabolism) หรือสูงเกินระดับปกติ (oxidative burst)ระบบเอนไซม์ (antioxidant enzymes) เกี่ยวข้องกับหน้าที่ของกลุ่มเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutases; SOD) เปลี่ยนซุปเปอร์ออกไซด์เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และกลุ่มเอนไซม์ที่เปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นน้ำและออกซิเจน ได้แก่ เอนไซม์คะตาเลส (catalase) และเปอร์ออกซิเดส (peroxidases) เนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จัดเป็น ROS ชนิดหนึ่ง ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษากับเอนไซม์ 2 ชนิด คือ CuZn-SOD และ แอสคอร์เบตเปอร์ออกซิ-เดส (APX) ด้วยเหตุผลว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้มีกิจกรรมอยู่ในทุกส่วนของเซลล์พืชที่เป็นแหล่งเกิดอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์ คือ ไซโตพลาสซึม ไมโตคอนเดรีย (และรวมทั้งในคลอโรพลาสต์) (Palma et al. 1987; Marco et al. 1999; Mittler 2002)

จากการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะและใช้วิธี RT-PCR ศึกษาการแสดงออกของยีน *CuZn-SOD* และ *APX* ในตาที่ระยะพักตัว (ระยะที่ 1) เปรียบเทียบกับตาซึ่งเกิดกระตุ้นการงอกสังเกตได้จากการเปลี่ยนรูปร่างและสัณฐาน 5 ระยะซึ่งยังไม่เกิดยอดอ่อน (พรพิมล เจียระนัยปรีเปรม และคณะ 2554; ภาคผนวกที่ 1) ปรากฏว่าไพรเมอร์ทำปฏิกิริยากับบริเวณเฉพาะตามที่ต้องการ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการติดตามการแสดงออกของ ยีน *18S rRNA* ข้างต้นแล้ว ระดับการแสดงออกของทั้ง *CuZn*-SOD และ *APX* ไม่คงที่ แต่เป็นไปในทำนองเดียวกัน คือ มีระดับการแสดงออกใกล้เคียงกันในตาระยะพักตัว (ระยะที่ 1) และระยะทันทีที่ออกจากการพักตัว (ระยะที่ 2) หลังจากนั้นระดับการแสดงออกลดลง เพิ่มขึ้นสูงอีกครั้งเมื่อเจริญถึงระยะที่ 5 แล้วลดลงในระยะที่ 6 ผลการทดลองนี้ไม่เป็นไปตามสมมติฐาน ซึ่งคาดว่าระดับการแสดงออกน่าจะสูงขึ้นตามระยะการเจริญของตา อย่างไรก็ตามจากการค้นคว้าข้อมูลอ้างอิง พบหลักฐานที่น่าสนใจในการทดลองกับหัวหอมใหญ่ (onion bulb) ซึ่ง Benkeblia and Shiomi (2004) รายงานไว้ว่าอัตราการหายใจของยอดอ่อน (sprout) สูงกว่าของตาที่พักตัว โดยไม่มีรายงานค่าอัตราการหายใจในช่วงเวลาระหว่าง 2 ระยะนั้น แต่วัดกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้สูงสุดที่ระยะเริ่มเกิดการกระตุ้นการออกจากภาวะพักตัวของตา หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงที่ระดับคงที่แล้วเพิ่มขึ้นเล็กน้อยก่อนถึงระยะเกิดยอดอ่อน ซึ่งค่อนข้างสอดคล้องกับผลการศึกษาในแก่นตะวันนี้ แต่ยังมีอีกปัจจัยหนึ่งซึ่งควบคุมไม่ได้ในการทดลอง คือ การผ่าหัวแก่นตะวันเป็นชิ้นเพื่อทำการทดลองกระตุ้นตาข้างนี้ เป็นปัจจัยกระตุ้นสภาวะเครียดออกซิเดทิฟ (oxidative stress) ขึ้น ซึ่งชักนำการเกิด ROS และสัญญานที่มีอิธิพลต่อการแสดงออกของเอนไซม์หลายระบบ (Minibayeva et al. 2009)