

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การสร้างพืชแปลงพันธุ์ที่มีการแสดงออกของยีนควบคุมจากวิถีชีวสังเคราะห์
ฟเลโวนอยด์และการทดสอบการต้านทานต่อสภาวะเครียด

Construction of Transgenic Plants Overexpressing Flavonoid Regulatory
Gene and Tests of Stress Resistance



ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2551

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....131078
วัน,เดือน,ปี.....22/11/2551

b.....12604008
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น หากท่านนำเอกสารนี้ไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสาร กรุณาแจ้งให้ทราบ

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์งบประมาณ ประจำปี 2551

การสร้างพืชแปลงพันธุ์ที่มีการแสดงออกของยีนควบคุมจากวิถีชีวสังเคราะห์

เฟลโวนอยด์และการทดสอบการต้านทานต่อสภาวะเครียด

Construction of Transgenic Plants Overexpressing Flavonoid Regulatory Gene and
Tests of Stress Resistance

กนกพร สมพรไพหลิน

คณะวิทยาศาสตร์ จสจ.

บทคัดย่อ

การโคลนยีนและการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบนำต้นยาสูบ หลังจากนั้นทำการคัดเลือกต้นยาสูบที่ได้รับยีน นำต้นที่ได้มาเลี้ยงในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันดังนี้คือ สภาวะแวดล้อมที่มีความเข้มแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 500 และ 800 ลักซ์ และ สภาวะแวดล้อมที่เพิ่มแรงดันออสโมติก โดยการเติมเกลือและน้ำตาล จากผลการทดลองพบว่า ต้นยาสูบที่ได้รับยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์แต่ละชนิดจะมีลักษณะทางสรีรวิทยา และการผลิตสารเฟลโวนอยด์แต่ละกลุ่มการตอบสนอง ต่อปัจจัยทดสอบแตกต่างกันออกไป โดยพบว่า ต้นยาสูบที่เลี้ยงในสภาพความเข้มแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 800 ลักซ์ ไม่ส่งผลให้พืชเกิดสภาวะเครียด นอกจากนี้ในต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* และ *TT8* ยังส่งเสริมให้มีการชักนำให้เกิดการสะสมสารกลุ่มฟลาวานอน เฟลโวน และเฟลโวนอล อย่างเด่นชัด ในขณะที่สายพันธุ์อื่นไม่มีความแตกต่างจากชุดควบคุม ต้นยาสูบทุกสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสภาวะที่เพิ่มแรงดันออสโมติก 2 สภาวะพบว่ามีสารสะสมเฟลโวนอยด์ที่ปลายชีวสังเคราะห์เพิ่มขึ้น โดยพืชที่มีการเพิ่มการแสดงออกของยีนกลุ่มเฟลโวนอยด์จะให้ลักษณะต้นที่ดีกว่าชุดควบคุม ดังนั้นสารกลุ่มเฟลโวนอยด์จึงน่าจะมีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพให้ทนต่อสภาวะเครียดของพืช

Abstract

Molecular cloning and gene transformation into tobaccos were performed. Transgenic tobacco were selected and used for studying in different conditions. Tobacco plants were subjected into various light intensities conditions (500 and 800 lux) or osmoticum media by adding salt or sugar. Our results showed that transgenic tobacco containing different genes from flavonoid biosynthesis presented the difference response in plant physiology and flavonoid production in each tested condition. At 800 lux light intensity, tobacco plant showed normal physiology similar to plant grown at 500 lux light intensity. Moreover transgenic tobacco containing F3'H and TT8 gene grown at 800 lux showed evidently high induction of flavanone flavone and flavonol, while the other transgenics did not different to the control. In both osmoticum media, all transgenic plants showed the accumulation of flavonoid for late biosynthetic pathway. Transgenic plants which overexpression of flavonoid biosynthetic gene showed the better characteristics than wild type. Thus flavonoids should have potential effects on plant stress tolerance.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่สนับสนุนทุนในการทำวิจัยและศึกษาในงานวิจัยนี้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ช
บทนำ	1
วิธีทดลอง	5
ผลการทดลอง	7
สรุปผลการทดลอง	22
เอกสารอ้างอิง	23



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 ปริมาณรังควัตถุสังเคราะห์แสงในสารสกัดจากต้นยาสูบปรกติและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (<i>TT8</i> , <i>F3'H</i> , <i>PAP2</i> และ <i>CHS</i>) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความเข้มแสง 500 และ 800 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน	9
ตารางที่ 3.2 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลโวน ในสารสกัดจากต้นยาสูบปรกติและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (<i>TT8</i> , <i>F3'H</i> , <i>PAP2</i> และ <i>CHS</i>) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความเข้มแสง 500 และ 800 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน ค่าการดูดกลืนแสงของสารลูทีโอลินที่ 350 นาโนเมตรและอะพิจินินที่ 336 นาโนเมตร	11
ตารางที่ 3.3 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลโวนอล ในสารสกัดจากต้นยาสูบปรกติและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (<i>TT8</i> , <i>F3'H</i> , <i>PAP2</i> และ <i>CHS</i>) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความเข้มแสง 500 และ 800 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน ค่าการดูดกลืนแสงของสารเคอร์เซตินที่ 374 นาโนเมตร, สารเคเอ็มพีรอลที่ 368 นาโนเมตร และไมริเซตินที่ 378 นาโนเมตร	12
ตารางที่ 3.4 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มแอนโทไซยานิน ในสารสกัดจากต้นยาสูบปรกติและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (<i>TT8</i> , <i>F3'H</i> , <i>PAP2</i> และ <i>CHS</i>) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความเข้มแสง 500 และ 800 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน ค่าการดูดกลืนแสงของสารเคลฟิโนดินที่ 546 นาโนเมตร, สารไซยานิดินที่ 535 นาโนเมตร และ สารเพลาโกนินิดิน 520 นาโนเมตร	13
ตารางที่ 3.5 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลโวน ในสารสกัดจากต้นยาสูบปรกติและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (<i>CHS</i> , <i>F3'Has</i> , <i>F3'Has</i> , <i>DFRs</i> และ <i>DFRas</i>) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีระดับเกลือความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 15 วัน ค่าการดูดกลืนแสงของสารลูทีโอลินที่ 350 นาโนเมตรและอะพิจินินที่ 336 นาโนเมตร	15
ตารางที่ 3.6 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลโวนอล ในสารสกัดจากต้นยาสูบปรกติและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์	

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่ยังไม่ผ่านการแก้ไขและอาจมีข้อผิดพลาดได้ ขอสงวนสิทธิ์ในเนื้อหา
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(*CHS, F3'Hs, F3'Has, DFRs* และ *DFRas*) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีระดับเกลือความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 15 วัน ค่าการดูดกลืนแสงของสารเคอร์เซตินที่ 374 นาโนเมตร, สารเคเอ็มพีรอลที่ 368 นาโนเมตร และไมริเซตินที่ 378 นาโนเมตร

16

ตารางที่ 3.7 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มแอนโทไซยานิน ในสารสกัดจากต้นยาสูบปรกติและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (*CHS, F3'Hs, F3'Has, DFRs* และ *DFRas*) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีระดับเกลือความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 15 วัน ค่าการดูดกลืนแสงของสารเคลฟิโนดินที่ 546 นาโนเมตร, สารไซยานิดินที่ 535 นาโนเมตร และ สารเพลาโกนินิดิน 520 นาโนเมตร

17

ตารางที่ 3.8 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลโวนในสารสกัดจากต้นยาสูบปรกติและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (*CHS, F3'Hs, F3'Has, DFRs* และ *DFRas*) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีระดับน้ำตาลความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 15 วัน ค่าการดูดกลืนแสงของสารลูทีโอลินที่ 350 นาโนเมตรและอะพิจินินที่ 336 นาโนเมตร

19

ตารางที่ 3.9 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลโวนอล ในสารสกัดจากต้นยาสูบปรกติและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (*CHS, F3'Hs, F3'Has, DFRs* และ *DFRas*) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีระดับน้ำตาลความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 15 วัน ค่าการดูดกลืนแสงของสารเคอร์เซติน ที่ 374 นาโนเมตร, สารเคเอ็มพีรอลที่ 368 นาโนเมตร และไมริเซตินที่ 378 นาโนเมตร

20

ตารางที่ 3.10 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มแอนโทไซยานินในสารสกัดจากต้นยาสูบปรกติและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (*CHS, F3'Hs, F3'Has, DFRs* และ *DFRas*) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีระดับน้ำตาลความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 15 วัน ค่าการดูดกลืนแสงของสารเคลฟิโนดินที่ 546 นาโนเมตร, สารไซยานิดินที่ 535 นาโนเมตร และ สารเพลาโกนินิดิน 520 นาโนเมตร

21

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.1 วิธีชีวิตสังเคราะห์ฟีนิล โพรพานอยด์ที่เกี่ยวข้องกับการชักนำโดยความเครียด	4
รูปที่ 3.1 ต้นยาสูบทดลองสายพันธุ์ต่างๆ ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 500 และ 800 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน	7
รูปที่ 3.2 ต้นยาสูบที่เจริญในอาหาร MS ที่มีเกลือความเข้มข้น 50 mM เป็นระยะเวลา 15 วัน	14
รูปที่ 3.3 ต้นยาสูบที่เจริญในอาหาร MS ที่มีน้ำตาลความเข้มข้น 5% เป็นระยะเวลา 15 วัน	18



1. บทนำ

ปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมเสื่อมโทรม กำลังเป็นปัญหาสำคัญที่เกษตรกรทั่วโลกกำลังประสบอยู่ โดยเฉพาะสภาวะแห้งแล้ง ดินเค็ม ที่ทวีความรุนแรงยิ่งขึ้น เกษตรกรซึ่งเป็นประชากรหลักของประเทศจะต้องประสบปัญหาสูญเสียผลผลิตทางการเกษตรเป็นมูลค่ามหาศาล เนื่องจากเกษตรกรไทยส่วนใหญ่จะมีการจัดการระบบในการเพาะปลูกแบบดั้งเดิมและพึ่งพาสภาวะแวดล้อม การศึกษาถึงสารที่พืชผลิตขึ้นเพื่อให้พืชต้านทานต่อสภาวะเครียดได้เพิ่มมากขึ้น จึงน่าจะมีความเหมาะสมต่อการคัดเลือกพันธุ์สำหรับเกษตรกรและการปรับปรุงพันธุ์พืชต้านทานต่อไป เมื่อสิ่งแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงพืชจะมีกลไกทางเมแทบอลิซึมที่จำเพาะ เพื่อตอบสนองการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว โดยจะผลิตสารทุติยภูมิจากชีวสังเคราะห์ที่พื้นฐานมากมายหลายชนิด เฟลโวนอยด์ จัดเป็นสารกลุ่มสำคัญกลุ่มหนึ่งที่พืชสร้างขึ้นที่พืชสร้างขึ้นเพื่อตามสนองต่อความเครียด มักพบทั่วไปในพืชที่มีระบบท่อลำเลียง สารกลุ่มนี้มีความหลากหลายและมีหน้าที่ที่แตกต่างกันออกไป ได้แก่ ให้สีสันทันดอก ผล เมล็ด เพื่อให้แมลงช่วยผสมละอองเกสรและกระจายเมล็ด ป้องกันพืชจากรังสีอัลตราไวโอเล็ต ป้องกันพืชจากโรคแมลงต่างๆ ช่วยให้พืชสืบพันธุ์ได้ เป็นสัญญาณทางชีวโมเลกุลในพืช

เมื่อพืชได้รับความเครียดจากสภาวะแวดล้อมที่ผิดปกติทั้งจากสิ่งที่มีและไม่มีชีวิต พืชจะเกิดการปรับตัวให้สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะดังกล่าว พืชแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์จะมีกลไกในการปรับตัวที่แตกต่างกันออกไป กลไกการตอบสนองภายในเซลล์พืชจะเกิดขึ้นโดยพืชจะสร้าง reactive oxygen species (ROS) ขึ้นภายในเซลล์พืชอย่างรวดเร็ว (Pitzschke และคณะ 2006) ROS เหล่านี้จะมีผลต่อสิ่งมีชีวิตได้ 2 แนวทาง แนวทางแรก คือ ROS ในระดับความเข้มข้นที่สูงจะมีผลในการทำลายเนื้อเยื่อพืชและถ้าเกิดการทำลายมากพืชก็อาจจะตายได้ (Girrotti, 2001) แนวทางที่สอง นั้นระดับ ROS ที่ต่ำ จะทำหน้าที่เป็นสัญญาณโมเลกุลในการชักนำให้เกิดการถ่ายทอดสัญญาณอื่นๆ ในเซลล์พืช รวมทั้งมีผลต่อการแสดงออกของยีน ซึ่งมีผลทำให้พืชสามารถปรับตัวต่อสภาวะเครียดและบรรเทาผลกระทบที่เกิดจากสิ่งแวดล้อมดังกล่าว (Mittler และคณะ 2004) ในพืชนั้นส่วนใหญ่จะเกิด ROS ในคลอโรพลาสต์และเพอร์ออกซิโซม บริเวณที่เป็นบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในระบบการสังเคราะห์ด้วยแสง (Noctor และ Foyer, 2000) ดังนั้นพืชจำเป็นต้องพยายามปรับกลไกทางด้านชีวเคมีภายในเซลล์พืช เพื่อให้คลอโรพลาสต์ทำงานได้อย่างเป็นปกติ เช่น โดยการสร้างสารเพื่อลดแรงดันออกซิเดติก สร้างโปรตีนจำเพาะเพื่อควบคุมปริมาณ ROS รวมทั้งการผลิตสารทุติยภูมิ เพื่อการปรับสภาวะให้เหมาะสม

สารกลุ่มเฟลโวนอยด์ เป็นสารทุติยภูมิที่ได้จากฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) โดยการทำงานของเอนไซม์ phenylalanine ammonia-lyase (PAL) ให้ผลผลิตเป็นกรดซินนามิก (cinnamic acid) ตามด้วยการเติมหมู่ไฮดรอกซีที่วงฟีนิลได้เป็นกรดคูมาริก (coumaric acid) โดยเอนไซม์ cinnamic acid 4-hydroxylase (C4H) ซึ่งจะมีการสร้างพันธะไทโอเอสเทอร์ (thioester bond)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระหว่างหมู่คาร์บอกซีของกรดคูมาริกกับ CoA โดยเอนไซม์ hydroxycinnamate CoA ligase (4CL) ทำให้ได้สารคูมาริลโคเอ (Nole และคณะ 2005)

สารกลุ่มฟเลโวนอยด์ (flavonoid) เป็นสารที่มีคาร์บอน 15 อะตอม สังเคราะห์ได้จากการทำงานของเอนไซม์ chalcone synthase (CHS) ซึ่งจะกระตุ้นการรวมตัวกับของสารตั้งต้น คือ คูมาโรลิลโคเอ (*p*-coumaroyl-CoA) กับมาโลนิลโคเอ (malonyl-CoA) 3 โมเลกุลได้เป็นสารเตตระไฮดรอกซีซาลอน (tetrahydrochalcone) ที่จะสามารถเปลี่ยนไปเป็นสารกลุ่มฟเลโวนอยด์ได้หลายชนิด เช่น ฟเลโวน (flavone) เฟลวานอน (flavanone) เฟลวานอล (flavanol) และแอนโทไซยานิน (anthocyanin) เป็นต้น (รูปที่ 1.1) การเปลี่ยนแปลงของหมู่ย่อยภายในโครงสร้างหลักโดยการเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ เช่น hydroxylation glycosylation acylation และ methylation มีผลทำให้สารกลุ่มนี้มีโครงสร้างที่หลากหลาย และจะส่งผลต่อหน้าที่ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน (Sompornpailin, 2002)

มีรายงานว่าเมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียดทั้งจากสภาพแวดล้อมและจากโรคแมลงศัตรูพืช กลไกภายในเซลล์พืชจะกระตุ้นให้เกิดการหลั่งสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกออกมา พืชจะมีการหลั่งสารนี้เพื่อต่อต้านการเข้าทำลายของโรคพืช สารเหล่านี้ได้แก่ pterocarpan isoflavan stilbenes coumarin flavonol เป็นต้น (Dixon และ Nancy, 1995) และยังมีรายงานการสะสมสารกลุ่มฟเลโวนอยด์ เช่น kaempferol และอนุพันธ์ เมื่อต้นพืชเนี่ยเกิดบาดแผล และเมื่อได้รับการผสมของเกสร (Mo และคณะ 1992; Vander Meer และคณะ 1992) อีกทั้งยังพบการสะสมของสารกลุ่มแอนโทไซยานินและฟเลโวนต่อการตอบสนองต่อการได้รับแสงในปริมาณที่สูง ซึ่งคาดว่าจะช่วยดูดซับรังสียูวี (UV) ที่จะทำอันตรายต่อเซลล์พืช ซึ่งยูวีบี (UV-B) นี้จะมีผลทำให้ดีเอ็นเอเกิด ไดเมอร์ (dimer) หรือเกิดการแตกหักขึ้น และพบรายงานว่าถ้าให้สารตั้งต้นของเอนไซม์ CHS เพื่อที่จะสังเคราะห์สารภายในกลุ่มฟเลโวนอยด์พบว่าพืชสามารถต้านทานต่อเชื้อรา *Botrytis cinerea* ได้มากขึ้น (Dixon และ Nancy, 1995) นอกจากนี้พบว่าสารกลุ่มฟเลโวนอยด์จะมีความสำคัญในการลดความรุนแรงจากสภาวะเครียดทั้งจากสิ่งที่มีและไม่มีชีวิตแล้ว ยังพบว่ามีส่วนช่วยให้พืชปรับตัวเป็นปกติได้รวดเร็วขึ้นหลังจากที่ได้รับสภาวะเครียดแล้ว (Gould 2004)

การที่พืชผลิตสารปฐมภูมิและทุติยภูมิที่มีความหลากหลายนั้นคาดว่า เนื่องจากสารแต่ละชนิดอาจมีหน้าที่จำเพาะที่แตกต่างกันไป นักวิจัยทั่วโลกได้พยายามทำการศึกษาถึงสารออกฤทธิ์ที่จำเพาะต่อการปรับตัวเพื่อให้พืชสามารถทนต่อสภาวะเครียดได้ โดยทำการสกัดและแยกสารให้บริสุทธิ์ก่อนทำการทดสอบ ซึ่งจะต้องใช้ระยะเวลานานในการทำงานและเสียค่าใช้จ่ายสูง ซึ่งในปัจจุบันพบว่าในกลไกการปรับตัวพืชสร้างสารหลายชนิดขึ้นเพื่อการอยู่รอด การใช้สารบริสุทธิ์บางกลุ่มจึงมีผลให้ความพยายามในการทำงานดังกล่าวไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควรและต้องค้นคว้าเพิ่มเติมขึ้นเรื่อยๆ

พืชแต่ละสายพันธุ์จะมีความสามารถในการต้านทานต่อสภาวะเครียดที่แตกต่างกัน ในสภาวะเครียดจะกระตุ้นให้พืชเกิดการปรับตัวเพื่อให้สามารถทนต่อสภาวะเครียดต่างๆ ได้ โดยพืชจะตอบสนองแบบเครือข่าย (network) อย่างต่อเนื่อง ทำให้เกิดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาวะเครียดเพื่อการปรับตัวในด้านการพัฒนา ชีวเคมี และสรีรวิทยาต่อความเครียดจากสิ่งแวดล้อม (Buitink และคณะ 2006; Rohila, 2006)

ในงานวิจัยนี้ได้อาศัยความรู้เกี่ยวกับวิถีชีวิตสังเคราะห์สาร และเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการสร้างพืชที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ชนิดต่างๆ จากวิถีชีวิตสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีผลต่อการสร้างสารกลุ่มที่แตกต่างกัน และการทดสอบประสิทธิภาพการต้านทานต่อสภาวะเครียดจากความแห้งแล้งและความเค็ม เพื่อเป็นแนวทางสำหรับการศึกษานิตของสารที่พืชผลิตขึ้นเพื่อให้ต้านทานต่อสภาวะเครียดได้เพิ่มมากขึ้น เพื่อใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยการผสมพันธุ์เพื่อให้ได้สารกลุ่มที่สามารถทนต่อสภาวะเครียดสูง หรือการใช้เทคนิคการถ่ายโอนยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวิตสังเคราะห์ของกลุ่มสารนั้นเข้าสู่พืชโดยตรง ซึ่งจะได้ผลที่รวดเร็วในระยะเวลาดำเนิน

สารพอลิฟีนอลกลุ่มเฟลโวนอยด์ พบว่ามีการสะสมได้ในพืชทั่วไป และมีรายงานว่ามักมีการสร้างและสะสมตอบสนองต่อสภาวะเครียด สารกลุ่มเฟลโวนอยด์มีกลุ่มย่อยอยู่หลายชนิด ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน ในงานวิจัยครั้งนี้จึงเน้นการศึกษาถึงการทำให้พืชทดสอบมีการแสดงออกของ ยีนกลุ่มที่อยู่ในวิถีชีวิตสังเคราะห์เฟลโวนอยด์บางชนิดสูงกว่าปกติ สำหรับศึกษาถึงชนิดกลุ่มสารย่อยที่ตอบสนองต่อสภาวะเครียดแต่ละชนิด เพื่อการศึกษาในกลไกการทำงานในระดับลึก และเพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงและคัดเลือกพันธุ์พืชต่อไป

2. วิธีการทดลอง

1. การโคลนยีนโดยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR)

การทำพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนที่ต้องการ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับใช้เพิ่มปริมาณยีนที่ต้องการ ซึ่งมีปฏิกิริยาของการทำพีซีอาร์ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ (cDNA) 10xTaq buffer, แมกนีเซียมคลอไรด์, dNTP, ฟอว์เวิร์คไพรเมอร์และรีเวิร์สไพรเมอร์ของยีนแต่ละชนิด, Taq DNA polymerase

สำหรับสถานะในการทำปฏิกิริยาของพีซีอาร์ คือ การทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพตามธรรมชาติ (denaturing) โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นให้ไพรเมอร์เข้าจับกับสายดีเอ็นเอเป้าหมาย (annealing) ที่อุณหภูมิตามความเหมาะสมของไพรเมอร์แต่ละชนิด และการเข้าสู่สายดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ โดยการทำงานของเอ็นไซม์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (extention) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

นำส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณไปตรวจสอบขนาดโดยการทำอะกาโรส-เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากเจลอะกาโรส และทำให้บริสุทธิ์

2. การเชื่อมต่อนชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์ (ligation) และการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่ *E.coli*

การเชื่อมต่อนชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยการทำพีซีอาร์ ที่ทำการตรวจสอบขนาดแล้ว เข้ากับเวกเตอร์ pGEM (Promega) โดยใช้เทคนิค T-A cloning และทำการถ่ายโอนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เชื่อมต้อยู่กับเวกเตอร์ pGEM เข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ โดยวิธีการ heat-shock เพื่อเพิ่มปริมาณของยีนที่ต้องการในเซลล์เจ้าบ้าน (host) ได้แก่ เซลล์ของแบคทีเรีย *E.coli* ที่ทำการเตรียมพร้อม หรือคอมพีเทนต์เซลล์ และคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าจะได้พลาสมิด ซึ่งมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอแทรก โดยการคัดเลือกในอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน IPTG และ X-gal สเปรตสารแขวนลอยเซลล์ที่ทำการถ่ายโอนพลาสมิด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วจึงทำการสกัดพลาสมิดที่คัดเลือกตรวจสอบ พลาสมิดที่สกัดได้โดยทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อนำศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3. การคัดเลือกพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอแทรกอยู่

ใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ตามชนิดของยีนที่ต้องการพิสูจน์ แล้วจึงนำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ตัดได้ไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อดูขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดได้เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก GenBank นำไปค้นหาจุดตัดสำหรับการตรวจสอบโคลนที่ได้และทำการคำนวณขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่คาดไว้

4. การเชื่อมต่อยีนส่วนดีเอ็นเอ กับ *Agrobacterium* expression vector

นำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ตรวจสอบแล้ว เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pBI121 โดยวิธีการ heat-shock

5. ขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรียและชักนำให้เกิดต้น

ถ่ายโอนพลาสมิด pBI121 ที่มีส่วนของยีนที่ต้องการแทรกอยู่ในบริเวณของ T-DNA เข้าสู่อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 ตัดใบยาสูบที่ปราศจากเชื้อขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 เซนติเมตร แช่ลงในเซลล์แขวนลอยประมาณ 30 ถึง 60 วินาที นำใบยาสูบวางบนอาหารแข็ง MS สูตรชักนำให้เกิดแคลลัส บ่มได้แสงไฟ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ย้ายใบยาสูบลงในอาหารแข็ง MS สูตรชักนำให้เกิดแคลลัส ที่มียาปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือก และยาปฏิชีวนะคาร์เบนซิลลินเพื่อฆ่าอะโกรแบคทีเรีย เลี้ยงเนื้อเยื่อจนเกิดเป็นแคลลัส แล้วจึงย้ายลงในอาหารแข็ง MS สูตรชักนำให้เกิดยอดที่มียาปฏิชีวนะคาร์เบนซิลลิน และยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือกเลี้ยงจนแคลลัสเกิดเป็นยอด คัดเลือกยอดที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีนย้ายลงอาหารแข็ง MS สูตรปกติที่มียาปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือกจากนั้นคัดเลือกยอดที่เกิดราก ซึ่งคาดว่าจะเป็ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน

6. การเพิ่มจำนวนต้นเพื่อใช้สำหรับการทดสอบสถานะเครียด

นำต้นยาสูบทั้งต้นปกติและต้นดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่ต้องการแล้ว นำมาตัดยอดและนำไปเลี้ยงในอาหาร MS เพื่อเพิ่มจำนวน

7. การทดสอบสถานะเครียดจากสภาพแวดล้อมทางกายภาพ

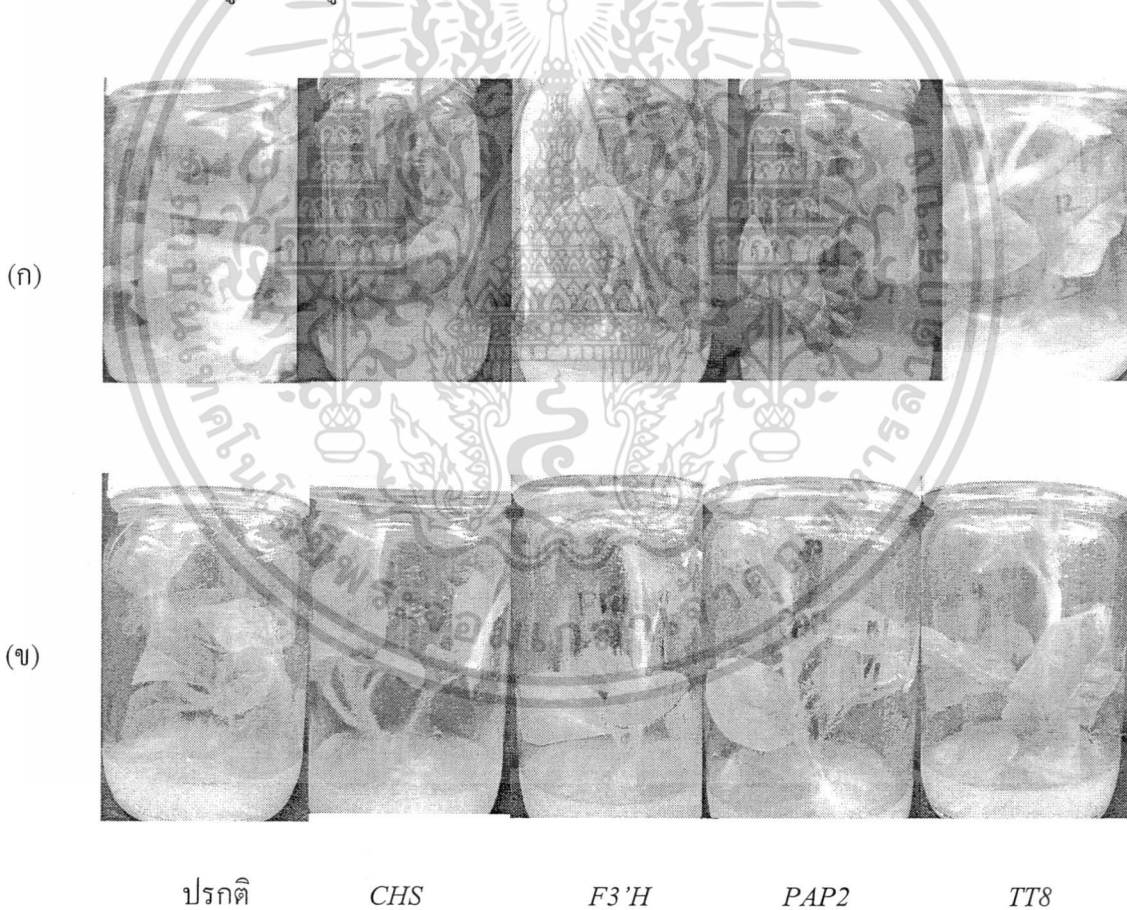
นำต้นยาสูบปกติและต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมมาทดสอบในอาหาร MS ในสภาวะเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มแสงมากกว่าปกติ (800 ลักซ์) ส่วนหนึ่งทดสอบในอาหาร MS ที่มี สภาวะเครียดจากความเค็ม (โซเดียมคลอไรด์) สภาวะเครียดจากแรงดันออสโมติก (น้ำตาล) จากนั้นนำมาวัดการเจริญเติบโตและวัดการผลิตสารในกลุ่มฟีนอลิก (Sompompailin และ Maneprasert, 2004)

3 ผลการทดลอง

3.1 ผลของแสงที่มีต่อการแสดงออกของต้นยาสูบทดลอง

นำพืชทดลอง (ต้นยาสูบปรกติและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *TT8*, *F3'H*, *CHS* และ *PAP2*) ที่มีลักษณะสมบูรณ์และอายุใกล้เคียงกัน มาเลี้ยงภายใต้สภาวะแสงต่างๆ ได้แก่ แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 500 ลักซ์ สำหรับชุดควบคุม และ 800 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นตรวจสอบปริมาณรงควัตถุสังเคราะห์แสง และปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

การเจริญเติบโตของต้นยาสูบทดลอง ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 800 ลักซ์ มีการเจริญที่ใกล้เคียงกันโดยมีลำต้นยืดยาวขึ้น ใบด้านล่างของต้นมีสีเขียวซีดที่ขอบใบเฉลี่ยต้นละ 1-2 ใบ ส่วนยอดมีสีเขียวเข้ม ดังรูปที่ 3.1 (ก) ในขณะที่ต้นยาสูบชุดควบคุม คือ ต้นยาสูบที่เพาะเลี้ยงใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 500 ลักซ์ มีลักษณะลำต้นและใบเป็นสีเขียวเข้ม ลำต้นมีการยืดยาวขึ้น ดังรูปที่ 3.1(ข)



รูปที่ 3.1 ต้นยาสูบทดลองสายพันธุ์ต่างๆ ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 500 และ 800 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของต้นพืชทดลอง โดยศึกษาจากปริมาณการเปลี่ยนแปลงของรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงซึ่งได้แก่ คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ความยาวคลื่น 662 644 และ 470 นาโนเมตร แล้วคำนวณปริมาณรงควัตถุชนิดต่างๆ ในหน่วยไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ของต้นยาสูบทั้ง 5 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 800 ลักซ์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้ง 2 ชนิดและแคโรทีนอยด์ ของต้นยาสูบที่เพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 500 ลักซ์ (ชุดควบคุม) ดังตารางที่ 3.1



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 ปริมาณรังควัตถุสังเคราะห์แสงในสารสกัดจากต้นยาสูบปรกติ และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (*TT8*, *F3'H*, *PAP2* และ *CHS*) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 500 และ 800 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($P \leq 0.05$)

สายพันธุ์	ความเข้มแสง (ลักซ์)	ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด)	ปริมาณคลอโรฟิลล์บี (ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด)
ต้นปรกติ	500	3.056a	0.805d	9.767bc
	800	2.887a	0.811d	9.688bc
ต้น <i>TT8</i>	500	2.976a	0.825cd	9.435c
	800	3.196a	0.887bcd	9.714bc
ต้น <i>F3'H</i>	500	3.577a	1.034a	11.546a
	800	3.602a	1.006abc	10.748ab
ต้น <i>PAP2</i>	500	3.143a	1.004ab	10.023abc
	800	3.088a	1.087a	11.588a
ต้น <i>CHS</i>	500	2.989a	0.798d	9.573bc
	800	3.213a	0.820bcd	10.265abc

การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลโวน พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารลูทีโอลินของต้นยาสูบสายพันธุ์ *F3'H* มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สายพันธุ์ *TT8*, *PAP2* และ *CHS* มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่ต้นยาสูบปรกติมีค่าการดูดกลืนแสงลดลงเล็กน้อย ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนค่าการดูดกลืนแสงของสารอะพิจินินในต้นยาสูบสายพันธุ์ *F3'H* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่สายพันธุ์ปรกติ, *TT8* และ *PAP2* มีค่าการดูดกลืนแสงลดลงเล็กน้อย และสายพันธุ์ *CHS* มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่การเพิ่มขึ้นและลดลงนี้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังตารางที่ 3.2

การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลโวนอล พบว่าต้นยาสูบสายพันธุ์ปรกติ, *TT8*, *PAP2* และ *CHS* มีค่าการดูดกลืนแสงของสารไมริเซติน, สารเคเอ็มพีรอลและเคอร์เซตินเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่ต้นยาสูบ *F3'H* มีค่าการดูดกลืนแสงของสารไมริเซตินและเคเอ็มพีรอลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่ค่าการดูดกลืนแสงของสารเคอร์เซตินไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังตารางที่ 3.3

การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มแอนโทไซยานิน พบว่าสารเพลาโกนินดินในต้นยาสูบปรกติและต้นยาสูบ *TT8* มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนต้นยาสูบสายพันธุ์ *PAP2*, *F3'H* และ *CHS* มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนต้นยาสูบปรกติ, *PAP2*, *TT8* และ *CHS* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 800 ลักซ์ มีสารเคลฟีนิดินและไซยานิดินเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 500 ลักซ์ ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม ขณะที่ต้นยาสูบ *F3'H* มีค่าการดูดกลืนแสงลดลงเล็กน้อยอย่างไม่มีความต่างทางสถิติ ดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.2 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลโวน ในสารสกัดจากต้นยาสูบปรกติและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (*TT8*, *F3'H*, *PAP2* และ *CHS*) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 500 และ 800 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน ค่าการดูดกลืนแสงของสารลูที-โอดินที่ 350 นาโนเมตรและอะพิจินินที่ 336 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($P \leq 0.05$)

สายพันธุ์	ความเข้มแสง (ลักซ์)	อะพิจินิน (ค่าการดูดกลืนแสง/กรัมน้ำหนักสด)	ลูทีโอดิน (ค่าการดูดกลืนแสง/กรัมน้ำหนักสด)
ต้นปรกติ	500	1.207bcd	0.822cde
	800	1.186bcd	0.715de
ต้น <i>TT8</i>	500	1.624a	1.159abc
	800	1.393ab	1.506a
ต้น <i>F3'H</i>	500	0.964d	0.930cde
	800	1.655a	1.396ab
ต้น <i>PAP2</i>	500	1.381bc	0.986cde
	800	1.121bcd	1.087bcd
ต้น <i>CHS</i>	500	1.007cd	0.611e
	800	1.213bcd	0.819cde

ตารางที่ 3.3 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ในสารสกัดจากต้นยาสูบปรกติและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ (*TT8*, *F3'H*, *PAP2* และ *CHS*) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 500 และ 800 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน ค่าการดูดกลืนแสงของสารเคอร์เซตินที่ 374 นาโนเมตร, สารเคเอ็มพีรอลที่ 368 นาโนเมตร และไมริเซตินที่ 378 นาโนเมตรค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($P \leq 0.05$)

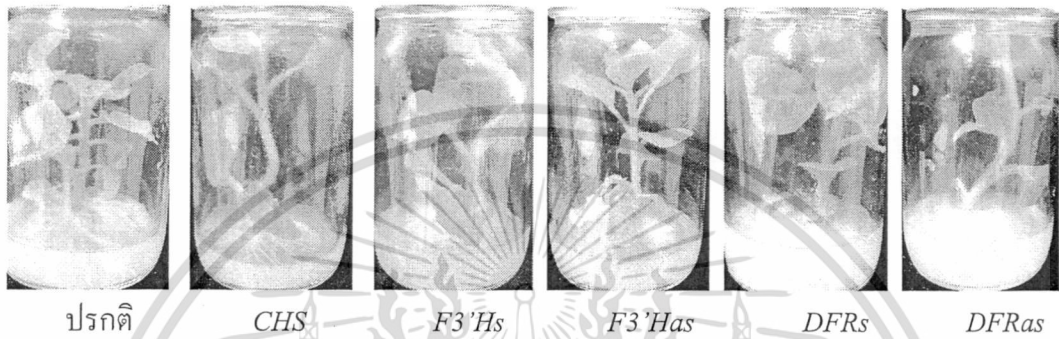
สายพันธุ์	ความเข้มแสง (ลักซ์)	เคเอ็มพีรอล (ค่าการดูดกลืนแสง/กรัม น้ำหนักสด)	เคอร์เซติน (ค่าการดูดกลืนแสง/กรัม น้ำหนักสด)	ไมริเซติน (ค่าการดูดกลืนแสง/กรัม น้ำหนักสด)
ต้นปรกติ	500	0.362c	0.297cd	0.273e
	800	0.293c	0.248d	0.281e
ต้น <i>TT8</i>	500	0.602b	0.517b	0.472d
	800	0.741ab	0.553b	0.481d
ต้น <i>F3'H</i>	500	0.609b	0.564ab	0.505d
	800	0.773a	0.693a	0.638a
ต้น <i>PAP2</i>	500	0.634ab	0.567ab	0.514cd
	800	0.658ab	0.572ab	0.553cd
ต้น <i>CHS</i>	500	0.408c	0.402c	0.360e
	800	0.412c	0.409c	0.365e

ตารางที่ 3.4 ผลการวัดค่า การดูดกลืนแสงของสารกลุ่มแอนโทไซยานิน ในสารสกัดจากต้นยาสูบปรกติและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชั่วสังเคราะห์เพลวออยด์ (*TT8*, *F3'H*, *PAP2* และ *CHS*) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 500 และ 800 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน ค่าการดูดกลืนแสงของสารเคลฟิโนดินที่ 546 นาโนเมตร, สารไซยานิดินที่ 535 นาโนเมตร และ สารเพลาโกนิน 520 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($P \leq 0.05$)

สายพันธุ์	ความเข้มแสง (ลักซ์)	เพลาโกนิน (ค่าการดูดกลืนแสง/กรัม น้ำหนักสด)	ไซยานิดิน (ค่าการดูดกลืนแสง/กรัม น้ำหนักสด)	เคลฟิโนดิน (ค่าการดูดกลืนแสง/กรัม น้ำหนักสด)
ต้นปรกติ	500	0.063ef	0.068ab	0.066cd
	800	0.084de	0.092ab	0.076c
ต้น <i>TT8</i>	500	0.082de	0.083ab	0.063cd
	800	0.116abc	0.103a	0.096abc
ต้น <i>F3'H</i>	500	0.094cde	0.096a	0.083abc
	800	0.097bcd	0.089ab	0.077bc
ต้น <i>PAP2</i>	500	0.122ab	0.113a	0.104ab
	800	0.129a	0.119a	0.106a
ต้น <i>CHS</i>	500	0.051f	0.046b	0.036e
	800	0.043f	0.041b	0.039de

3. 2 ผลของเกลือที่มีต่อการแสดงออกของต้นยาสูบทดลอง

ผลของเกลือต่อการเจริญเติบโตของต้นยาสูบสายพันธุ์ปรกติ เปรียบเทียบกับต้นที่ดัดแปลงพันธุกรรมในอาหาร MS ที่มีเกลือความเข้มข้น 50 mM พบว่าต้นยาสูบปรกติจะมีการเจริญที่ผิดปกติ ลำต้นแคระแกร็นมีใบที่โคนต้นเหลืองซีดเฉลี่ย 3 ใบ ต้นยาสูบ *CHS*, *F3'Has*, *F3'Has*, *DFRs* และ *DFRas* มีการเจริญคล้ายกัน คือ ต้นยาสูบมีการยืดของลำต้น ใบสีเขียวปรกติ ดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 ต้นยาสูบที่เจริญในอาหาร MS ที่มีเกลือความเข้มข้น 50 mM เป็นระยะเวลา 15 วัน

ค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลโวนจากสารสกัดต้นยาสูบที่ได้รับเกลือความเข้มข้น 50 mM พบว่าต้นยาสูบปรกติ *CHS*, *F3'Has* และ *DFRas* มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น ส่วนต้นยาสูบที่มียีน *F3'Has* และ *DFRs* มีการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงดังตารางที่ 3.5

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดต้นยาสูบกลุ่มเฟลโวนอล หลังจากที่ได้รับเกลือความเข้มข้น 50 mM พบว่าต้นยาสูบเกือบทุกชนิดมีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเล็กน้อยแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ยกเว้นต้นยาสูบ *CHS* ที่ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น และมีความแตกต่างทางทางสถิติ ในขณะที่ต้นยาสูบ *DFRs* มีค่าการดูดกลืนแสงคงที่ ดังแสดงในตารางที่ 3.6

ขณะที่ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดต้นยาสูบกลุ่มแอนโทไซยานิน หลังจากที่ได้รับเกลือความเข้มข้น 50 mM พบว่าต้นยาสูบทุกชนิดมีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในต้นยาสูบ *F3'Has*, *F3'Has* และ *DFRs* แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในต้นยาสูบปรกติ *CHS* และ *DFRas* ดังแสดงในตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.5 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลโวน ในสารสกัดจากต้นยาสูบปรกติและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (*CHS*, *F3'Hs*, *F3'Has*, *DFRs* และ *DFRas*) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาพที่มีระดับเกลือความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 15 วัน ค่าการดูดกลืนแสงของสารลูทีโอลินที่ 350 นาโนเมตรและอะพิจินินที่ 336 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($P \leq 0.05$)

สายพันธุ์	ความเข้มข้นของเกลือ (มิลลิโมลาร์)	อะพิจินิน (ค่าการดูดกลืนแสง/กรัมน้ำหนักสด)	ลูทีโอลิน (ค่าการดูดกลืนแสง/กรัมน้ำหนักสด)
ปรกติ	0	0.771b	0.510c
	50	1.112c	0.702de
<i>CHS</i>	0	1.032cd	0.743ef
	50	1.383e	0.921g
<i>F3'Hs</i>	0	0.942c	0.622d
	50	0.731b	0.470bc
<i>F3'Has</i>	0	1.302e	0.821f
	50	1.833f	0.974g
<i>DFRs</i>	0	0.611a	0.44 2bc
	50	0.502a	0.281a
<i>DFRas</i>	0	0.492a	0.372a
	50	0.914ce	0.660de

ตารางที่ 3.6 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ ในสารสกัดจากต้นยาสูบปรกติและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในพืชสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (*CHS*, *F3'Hs*, *F3'Has*, *DFRs* และ *DFRas*) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีระดับเกลือความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 15 วัน ค่าการดูดกลืนแสงของสารเคอร์เซตินที่ 374 นาโนเมตร, สารเคเอ็มพีรอลที่ 368 นาโนเมตร และไมริเซตินที่ 378 นาโนเมตรค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($P \leq 0.05$)

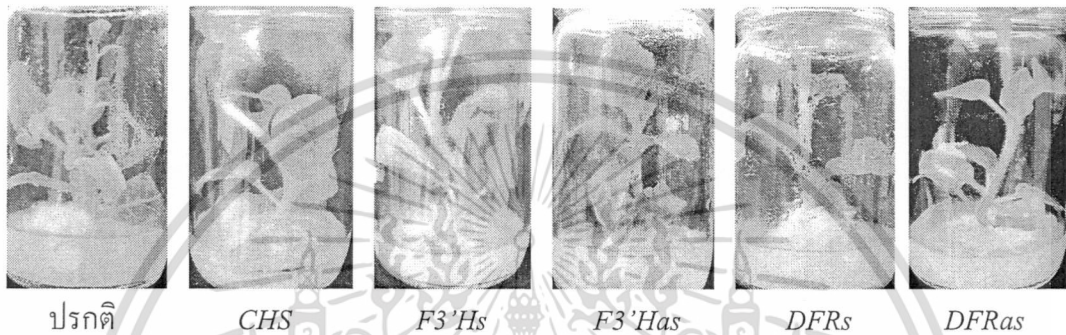
สายพันธุ์	ความเข้มข้นของเกลือ (มิลลิโมลาร์)	เคเอ็มพีรอล (ค่าการดูดกลืนแสง/กรัมน้ำหนักสด)	เคอร์เซติน (ค่าการดูดกลืนแสง/กรัมน้ำหนักสด)	ไมริเซติน (ค่าการดูดกลืนแสง/กรัมน้ำหนักสด)
ปรกติ	0	0.232ab	0.201ab	0.183a
	50	0.253ab	0.221ab	0.192a
<i>CHS</i>	0	0.261bc	0.232ab	0.212ab
	50	0.310c	0.280c	0.251b
<i>F3'Hs</i>	0	0.264abc	0.234ab	0.201a
	50	0.260a	0.242bc	0.212ab
<i>F3'Has</i>	0	0.211a	0.183a	0.172a
	50	0.222ab	0.191a	0.184a
<i>DFRs</i>	0	0.243ab	0.201ab	0.182a
	50	0.250ab	0.203ab	0.171a
<i>DFRas</i>	0	0.215ab	0.182a	0.172a
	50	0.252ab	0.224ab	0.200ab

ตารางที่ 3.7 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มแอนโทไซยานิน ในสารสกัดจากต้นยาสูบปรกติและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (*CHS*, *F3'Hs*, *F3'Has*, *DFRs* และ *DFRas*) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีระดับเกลือความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 15 วัน ค่าการดูดกลืนแสงของสารเตลฟีนิดินที่ 546 นาโนเมตร, สารไซยานิดินที่ 535 นาโนเมตร และ สารเพลาโกนินิดิน 520 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($P \leq 0.05$)

สายพันธุ์	ความเข้มข้นของเกลือ (มิลลิโมลาร์)	เพลาโกนินิดิน (ค่าการดูดกลืนแสง/กรัมน้ำหนักสด)	ไซยานิดิน (ค่าการดูดกลืนแสง/กรัมน้ำหนักสด)	เตลฟีนิดิน (ค่าการดูดกลืนแสง/กรัมน้ำหนักสด)
ปรกติ	0	0.016ab	0.013a	0.011a
	50	0.018ab	0.015a	0.013a
<i>CHS</i>	0	0.014a	0.011a	0.009a
	50	0.025c	0.022b	0.021b
<i>F3'Hs</i>	0	0.052f	0.040e	0.035d
	50	0.060g	0.058f	0.045e
<i>F3'Has</i>	0	0.035d	0.027bc	0.021b
	50	0.041e	0.035d	0.030d
<i>DFRs</i>	0	0.019b	0.015a	0.012a
	50	0.037de	0.032cd	0.028c
<i>DFRas</i>	0	0.014a	0.011a	0.010a
	50	0.017a	0.014a	0.012a

3.3. ผลของน้ำตาลต่อการแสดงออกของต้นยาสูบ

ผลของน้ำตาลต่อการเจริญเติบโตของต้นยาสูบ พบว่าต้นยาสูบสายพันธุ์ปรกติมีลำต้นแคระแกร็นมีใบประมาณ 3-5 ที่มีใบสีเหลืองซีดปลายใบหงิกงอ ลำต้นไม่มีการยืดขยายตัวออก ในขณะที่ต้นยาสูบ *CHS* และ *F3'Has* ลำต้นมีการยืดออกถึงฝ่าขวด ใบมีขนาดใหญ่สีเขียวสดไม่มีใบเหลืองซีด โดยเฉพาะในต้นยาสูบ *CHS* มีลำต้นและใบที่สมบูรณ์ ส่วนต้นยาสูบ *F3'Has* ต้นยาสูบมีลำต้นใหญ่แต่ลำต้นมีการเจริญยืดตัวที่ผิดปกติ และมีใบที่โคนต้นเฉลี่ย 1-2 ใบที่หงิกงอ ปลายใบไหม้ ต้นยาสูบ *DFRs* และ *DFRas* การเจริญใกล้เคียงกัน ดังรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 ต้นยาสูบที่เจริญในอาหาร MS ที่มีน้ำตาลความเข้มข้น 5% เป็นระยะเวลา 15 วัน

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดต้นยาสูบกลุ่มเฟลโวน พบว่าต้นต้นยาสูบทุกด้วยกเว้นต้นยาสูบ *F3'Has* และ *DFRs* มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในอาหารที่มีน้ำตาลเพิ่มขึ้น ต้นยาสูบ *F3'Has* และ *DFRs* มีค่าการดูดกลืนแสงของเฟลโวนลดลงแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ต้นยาสูบปรกติ และ *CHS* มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของสารเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ดังตารางที่ 3.8

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดต้นยาสูบกลุ่มเฟลโวนอล พบว่าต้นยาสูบปรกติ และ *CHS* มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นมีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนต้นยาสูบ *F3'Has*, *F3'Has* และ *DFRas* มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่ต้นยาสูบ *DFRs* มีค่าการดูดกลืนแสงลดลงเล็กน้อยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังตารางที่ 3.9

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดต้นยาสูบกลุ่มแอนโทไซยานิน พบว่าต้นยาสูบปรกติมีค่าการดูดกลืนแสงลดลงเล็กน้อย ต้นยาสูบ *CHS*, *F3'Has*, *DFRs* และ *DFRas* มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นมีความแตกต่างทางสถิติ ดังได้แสดงในตารางที่ 3.10 สำหรับต้นยาสูบ *DFRas* ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ควรจะลดลงแต่ผลการทดลองกลับมีค่ามากขึ้น น่าจะมาจากความผิดพลาดเกี่ยวกับอายุของต้นที่นำมาใช้ทดลองอาจเป็นต้นที่มีอายุมากเกินไป

ตารางที่ 3.8 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลโวน ในสารสกัดจากต้นยาสูบปรกติและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (*CHS*, *F3'Hs*, *F3'Has*, *DFRs* และ *DFRas*) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีระดับน้ำตาลความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 15 วัน ค่าการดูดกลืนแสงของสารลูทีโอลินที่ 350 นาโนเมตรและอะพิจินินที่ 336 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($P \leq 0.05$)

สายพันธุ์	ความเข้มข้นของน้ำตาล (%)	อะพิจินิน (ค่าการดูดกลืนแสง/กรัมน้ำหนักสด)	ลูทีโอลิน (ค่าการดูดกลืนแสง/กรัมน้ำหนักสด)
ปรกติ	3	0.771bc	0.510abc
	5	1.792f	1.273f
<i>CHS</i>	3	1.032d	0.743de
	5	1.923f	1.501g
<i>F3'Hs</i>	3	0.942cd	0.622bcd
	5	0.802bcd	0.612de
<i>F3'Has</i>	3	1.302e	0.821e
	5	1.801f	1.302f
<i>DFRs</i>	3	0.611ab	0.44 2ab
	5	1.021d	0.743de
<i>DFRas</i>	3	0.492a	0.372a
	5	0.673ab	0.523ab

ตารางที่ 3.9 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ ในสารสกัดจากต้นยาสูบปรกติและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (*CHS*, *F3'Hs*, *F3'Has*, *DFRs* และ *DFRas*) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีระดับน้ำตาลความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 15 วัน ค่าการดูดกลืนแสงของสารเคอร์เซตินที่ 374 นาโนเมตร, สารเคเอ็มพีรอลที่ 368 นาโนเมตร และไมริเซตินที่ 378 นาโนเมตรค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($P \leq 0.05$)

สายพันธุ์	ความเข้มข้นของน้ำตาล (%)	เคเอ็มพีรอล (ค่าการดูดกลืนแสง/กรัมน้ำหนักสด)	เคอร์เซติน (ค่าการดูดกลืนแสง/กรัมน้ำหนักสด)	ไมริเซติน (ค่าการดูดกลืนแสง/กรัมน้ำหนักสด)
ปรกติ	3	0.232ab	0.201abc	0.183ab
	5	0.312d	0.301f	0.251e
<i>CHS</i>	3	0.261bc	0.232cde	0.212bcd
	5	0.292cd	0.262ef	0.230cde
<i>F3'Hs</i>	3	0.264bc	0.234bcde	0.201abc
	5	0.273bc	0.252de	0.244de
<i>F3'Has</i>	3	0.211a	0.183a	0.172a
	5	0.230ab	0.211abcd	0.193ab
<i>DFRs</i>	3	0.243ab	0.201abc	0.182ab
	5	0.221ab	0.192abc	0.172ab
<i>DFRas</i>	3	0.215a	0.182a	0.172a
	5	0.252ab	0.221ab	0.202a

ตารางที่ 3.10 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มแอนโทไซยานิน ในสารสกัดจากต้นยาสูบปรกติและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (*CHS*, *F3'Hs*, *F3'Has*, *DFRs* และ *DFRas*) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีระดับน้ำตาลความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 15 วัน ค่าการดูดกลืนแสงของสารเตลฟีนิดินที่ 546 นาโนเมตร, สารไซยานิดินที่ 535 นาโนเมตร และ สารเพลาโกนิน 520 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($P \leq 0.05$)

สายพันธุ์	ความเข้มข้นของน้ำตาล (%)	เพลาโกนิน (ค่าการดูดกลืนแสง/กรัม น้ำหนักสด)	ไซยานิดิน (ค่าการดูดกลืนแสง/กรัม น้ำหนักสด)	เตลฟีนิดิน (ค่าการดูดกลืนแสง/กรัม น้ำหนักสด)
ปรกติ	3	0.016abc	0.013ab	0.011a
	5	0.016ab	0.012ab	0.010a
<i>CHS</i>	3	0.014a	0.011a	0.009a
	5	0.024d	0.021d	0.018cd
<i>F3'Hs</i>	3	0.052g	0.040g	0.035g
	5	0.063h	0.060h	0.047h
<i>F3'Has</i>	3	0.035f	0.027e	0.021de
	5	0.038f	0.031f	0.030g
<i>DFRs</i>	3	0.019bcd	0.015bc	0.012ab
	5	0.030e	0.025e	0.023ef
<i>DFRas</i>	3	0.014a	0.011a	0.010a
	5	0.021cd	0.019cd	0.012bc

4 สรุปผลการทดลอง

4.1 ผลของแสงที่มีต่อการแสดงออกของต้นยาสูบทดลอง

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาโดยดูจากปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงและศึกษาปริมาณสารในกลุ่มเฟลโวนอยด์ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเฉพาะตัวของสารแต่ละชนิด โดยวัดปริมาณสารต่างๆในต้นพืชทดลองที่เพาะเลี้ยงใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 800 ลักซ์ เปรียบเทียบกับปริมาณสารต่างๆในต้นยาสูบทดลองที่เพาะเลี้ยงใต้ความเข้มแสง 500 ลักซ์ พบว่า ต้นยาสูบปรกติมีการผลิตสารกลูโคแทนนิน (กลุ่มแทนนิน) เพิ่มเพียงกลุ่มเดียวเท่านั้น ต้นยาสูบสายพันธุ์ *TT8* สามารถผลิตสารเพลาโกนิน และซัลฟูเรตินได้เพิ่มขึ้น ส่วนต้นยาสูบสายพันธุ์ *F3'H* มีการผลิตสารกลุ่มเฟลโวน, กลูโคแทนนินและสารบางตัวในกลุ่มเฟลโวนอล (ไมริเซตินและเคเอ็มพีรอล) และกลุ่มฟลาโวน (เฮสเพอริดิน) ได้เพิ่มมากขึ้น สายพันธุ์ *PAP2* มีการผลิตสารกลูโคแทนนินและซัลฟูเรตินเพิ่มขึ้น ขณะที่ต้นสายพันธุ์ *CHS* ไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่มีนัยสำคัญทางสถิติเกิดขึ้น ส่วนปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง ซึ่งได้แก่ คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ ของต้นยาสูบทุกสายพันธุ์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

4.2. ผลของเกลือและน้ำตาลต่อการแสดงออกของต้นยาสูบ

จากการทดลองจะสังเกตได้ว่า เมื่อต้นยาสูบอยู่ในสภาวะที่มีเกลือ 50 mM และ น้ำตาล จะมีการแสดงออกของสารเฟลโวนอยด์ที่อยู่ปลายชีวสังเคราะห์ ได้แก่ สารกลุ่มเฟลโวน และแอนโทไซยานินตามลำดับเพิ่มสูงขึ้นกว่าสภาวะปรกติ ในการเพิ่มความต้านทานต่อสภาวะเครียดของพืชนั้น คาดว่าน่าจะต้องการสารกลุ่มเฟลโวนอยด์มากกว่า 1 ชนิด ในการทำงานร่วมกันเพื่อส่งผลให้พืชทนต่อสภาวะกดดันต่างๆได้

การวิเคราะห์ปริมาณสารเฟลโวนอยด์นี้ เป็นการศึกษาเพื่อดูแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงการสะสมของสารชนิดต่างในกลุ่มเฟลโวนอยด์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งอาจจะมีข้อผิดพลาดเกิดขึ้นคืออันเนื่องมาจากการบดบังของสารประกอบตัวอื่นๆในสารสกัด ดังนั้นการวัดการดูดกลืนแสงของความยาวคลื่นแสงเฉพาะของสารแต่ละตัวนั้นจึงเป็นการบอกคร่าวๆ ถึงแนวโน้มในการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของสารในแต่ละตัวเมื่อได้รับสภาวะเครียด เพื่อให้ทราบถึงความชัดเจนของทิศทางการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น อาจใช้เทคนิคการวิเคราะห์สารเพื่อให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นเช่น การใช้ HPLC หรือ GC เพื่อใช้ยืนยันผลการทดลองอีกครั้ง

5. เอกสารอ้างอิง

- Buitink, J., Leger, J. J., Guisle, I., Vu, B., Wulleme, S., Lamirault, G., Le Bars, A., Le Meur, N., Becker, A., Kuster, A. and Leprince, O. 2006. Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation-sensitive to desiccation-tolerant stages in *Medicago truncatula* seeds. *Plant J.* 47, 735-750.
- Crozier, A., J., Burns, A. A., A. J., Stewart, H. S., Rabiasz, G. I., Jenkins, C. A., Edwards, M. E. J., Lean, 2000. Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: measurements and bioavailability. *Biol. Res.* 33, 79-88.
- Dixon, R. A. and Nancy, L. P. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell.* 7, 1085-1097.
- Girotti, A. W. 2001. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *J Photochem. Photobiol. B.* 63, 103-113.
- Gould, K. S. 2004. Nature's Swiss army knife: The diverse protective roles of anthocyanins in leaves. *J. Biomed. Biotechnol.* 5, 314-320.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Van Breusegem, F. 2004. Reactive oxygen gene network of plant. *Trends Plant Sci.* 9, 490-498.
- Mo, Y., Nagel, C. and Taylor, L. P. 1992. Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in function pollen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 7213-7217.
- Noctor, G. and Foyer, C. H. 2000. Homeostasis of adenylate status during photosynthesis in a fluctuating environment. *J Exp Bot.* 51, 347-356.
- Noel, J. P., Austin, M. B. and Bomati, E. K. (2005). Structure-function relationships in plant phenylpropanoid biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol.* 8, 249-253
- Pitzschke, A., Forzani, C. and Hirt, H. 2006. Reactive oxygen species signaling in plants. *Antioxid. Redox. Signal.* 8, 1757-1764.
- Rohila, J. S., Chen, M., Chen, S., Chen, J., Cerny, R., Dardick, C., Canlas, P., Xu, X., Gribskov, M., Kanrar, S., Zhu, J. K., Ronald, P. and Fromm, M. E. 2006. Protein-protein interactions of tandem affinity purification-tagged protein kinases in rice. *Plant J.* 46, 1-13.
- Sompornpailin, K. 2002. Anthocyanin biosynthesis effects on plant color controlling. *J. KMUTT.* 10.

- Sompornpailin, K. and Maneprasert, R. 2004. Studies on stress conditions affecting flavonoid biosynthesis in plant tissue *via* tissue culture technique. *J. Science-Ladkrabang*. 13, 15-24.
- van der Meer, I. M., Stam, M. E., Van Tunen, A. J., Mol, J. N. M. and Stuitje, A. R. 1992. Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in petunia anthers results in male sterility. *Plant Cell*. 4, 253-282.
- Umezawa, T., Fujita, M., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. 2006. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Curr Opin Biotechnol*. 17, 113-122.
- Wasson, A. P., Pellerone, F. I. and Mathesius, U. 2006. Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia. *Plant Cell*. 18, 1617-1629.
- Winkel-Shirley, B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 218-223.

