



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การตอบสนองของพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีนในชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ต่อเชื้อ

ราก่อโรคพืชเศรษฐกิจ

Response of Genetically Modified Plants with Flavonoid Biosynthetic Gene to  
Fungi Infecting Economic Plants

กนกพร สมพรไพลิน

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2554

วิทยาลัยนาโนเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH  
SB  
123.57  
ก 124ก

เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน..... 131160

วัน, เดือน, ปี 22 พ.ค. 2557

b.12602401  
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์ของงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การตอบสนองของพืชตัดแปลงพันธุกรรมที่มียีนในชีวสังเคราะห์ เฟลไวโนอยด์ต่อเชื้อราก่อโรคพืชเศรษฐกิจ

แหล่งเงิน งานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2554 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 240,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตค. 53 ถึง 30 กย. 54

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการวิจัย กนกพร สมพรไพลิน

หน่วยงาน วิทยาลัยนาโนเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง

### บทคัดย่อ

เฟลไวโนอยด์เป็นสารทุติยภูมิที่พืชสร้างขึ้น มีหน้าที่หลากหลาย รวมทั้งการปกป้องพืชจากสภาวะกดดันจากสิ่งมีชีวิตและสิ่งที่ไม่มีชีวิต ในการทดลองนี้ได้นำ ต้นพืชตัดแปลงพันธุกรรมที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์เฟลไวโนอยด์โดยให้เอนไซม์ที่ rate limiting step (FR) และ ยีนให้เอนไซม์ที่เติมหมู่ไฮดรอกซี (FH) มาทำให้ติดเชื้อ *Rhizopus* sp. และ *Sclerotium rolfsii* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคเน่า ทำการเปรียบเทียบกับต้นยาสูบปรกติ หลังจากที่ได้รับเชื้อก่อโรคทั้งสองสายพันธุ์ พืช FR และพืช FH แสดงลักษณะทางสรีรวิทยาที่ดีกว่าพืชปรกติ พืช FH แสดงลักษณะที่ดีกว่าพืช FR และ พืชปรกติ โดยได้แสดงผลให้เห็นจากบริเวณที่ได้รับเชื้อ สังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการคงความเสถียรของของรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง (คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และคาโรทีนอยด์) พืช FR และพืช FH ที่ได้รับเชื้อมีการเพิ่มปริมาณสารฟีนอลิกที่ไอบามากกว่าพืชที่ไม่ได้รับเชื้อ และพืชปรกติ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าระดับของสารกลุ่มย่อย เฟลไวโนอยด์ ได้แก่ เฟลวาโนน เฟลไวโน เฟลไวโนอล ในพืช FH ที่ได้รับเชื้อ มีการเพิ่มสารมากที่สุด รองลงมาได้แก่ พืช FR และพืชปรกติ ดังนั้นสารกลุ่มเหล่านี้ น่าจะมีหน้าที่ที่สำคัญในการปกป้องพืชต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *Rhizopus* sp. และ *Sclerotium rolfsii*

คำสำคัญ : เฟลไวโนอยด์, พืชตัดแปลงพันธุกรรม, *Rhizopus* sp., *Sclerotium rolfsii*

**Research Title:** Response of Genetically Modified Plants with Flavonoid Biosynthetic Gene to Fungi  
Infecting Economic Plants

**Researcher:** Kanokpom Sompornpailin

**College of Nanotechnology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang**

### ABSTRACT

Flavonoids are plant secondary metabolites which have various biological functions, including plant protection against biotic and abiotic stresses. In this study, the stable transgenic tobaccos containing rate limiting step (FR) or hydroxylase enzymes (FH) involved in flavonoid biosynthesis were used for the infection of *Rhizopus* sp. and *Sclerotium rolfsii*, the plant pathogen causing fungi blight, in comparing with wild type. After infection, FR and FH plants showed the better physiological characteristics than wild type plants in both strains of plant pathogen. FH plant exhibited the greater ability to tolerate these pathogens than FR plants and wild type plants, respectively. These results are presented by microscope picture of infected areas and the stability level of photosynthetic pigments (chlorophyll A chlorophyll B and carotenoid). The infected FR and FH plants were greater increase in phenolic compounds in leaves than those in untreated transgenic leaves using fluorescence microscope, as well as in treated leaves of wild type tobacco. In this study, the level of flavonoid subgroups (flavanone, flavone, flavonol) in the infected FH plant had the highest increasing level following by those in the infected FH and wild type plants. Thus these substances may have an important function in plant protection against the infection of *Rhizopus* sp. and *Sclerotium rolfsii*.

**Keywords :** Flavonoids, Genetically Modified Plants, *Rhizopus* sp., *Sclerotium rolfsii*

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
สารบัญ.....	ค
สารบัญตาราง.....	ง
สารบัญภาพ.....	จ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b> .....	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย.....	2
1.5 สมมุติฐานงานวิจัย.....	2
1.6 กรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	3
1.7 คำสำคัญของการวิจัย.....	3
1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b> .....	<b>4</b>
2.1 แนวคิดทฤษฎีหลัก.....	4
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
<b>บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย</b> .....	<b>8</b>
3.1 การเตรียมต้นยาสูบและการทดสอบสภาวะการติดเชื้อโรคพืช.....	8
3.2 ตรวจสอบด้วยการสังเกตทางสรีรวิทยาของต้นและใบยาสูบ.....	8
3.3 ตรวจสอบการทำลายของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	8
3.4 ตรวจสอบปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง.....	8
3.5 ตรวจสอบการผลิตสารประกอบฟีนอลิกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์.....	9
3.6 การสะสมสารกลุ่มฟีนอลอยด์ ภายใต้สภาวะเครียด.....	9
3.7 การออกแบบทางสถิติ.....	9
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัย</b> .....	<b>10</b>
4.1 ผลของลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นยาสูบ.....	10

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2 ผลการทำลายของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	10
4.3 ผลของปริมาณแรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง.....	10
4.4 ผลการตรวจสอบสารประกอบฟีนอลิกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์.....	11
4.5 ผลการตรวจสอบการผลิตสารกลุ่มฟลิวโนอยด์ในต้นยาสูบภายใต้สภาวะเครียด.....	11
<b>บทที่ 5</b> สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	<b>14</b>
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	14
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	14
<b>บรรณานุกรม/เอกสารอ้างอิง</b> .....	<b>15</b>
<b>ประวัตินักวิจัย</b> .....	<b>17</b>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ส่วนประกอบของเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ....	5
2.2 การเกิดโรคเน่าในพืชจากเชื้อรา <i>Sclerotium</i> sp. ....	6
2.3 แสดงชีวิตสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ในอะราบิโดปซิส.....	7
4.1 แสดงผลการตรวจสอบลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อ <i>Rhizopus</i> sp. ....	11
4.2 แสดงผลการตรวจสอบลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อ <i>Sclerotium rolfsii</i> .....	11



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและ ความสำคัญ ของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในแต่ละปีพบว่า โรคพืชไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรียหรือเชื้อรา ได้ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตรอย่างมากมายมหาศาลในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด และส่งผลต่อเศรษฐกิจและการค้า ต้องมีการนำสารเคมีเพื่อป้องกันและกำจัดโรคพืชจากต่างประเทศ การใช้สารเคมีของเกษตรกรส่งผลให้เพิ่มค่าใช้จ่ายในการผลิตและมีสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม ซึ่งอาจส่งผลต่อผู้บริโภคและเกษตรกร

ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เป็นสารสีที่พบได้ทั่วไปในดอกไม้ ผลไม้ มีรายงานถึงการทำหน้าที่ที่มีความหลากหลายของสารกลุ่มนี้ ในการปกป้องพืชจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเช่นรังสีอัลตราไวโอเลต การขาดน้ำ และจากเชื้อก่อโรคจากไวรัส เชื้อรา แบคทีเรียต่างๆ (Schijlen และคณะ 2004) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงคุณสมบัติของฟลาโวนอยด์ที่ใช้ในด้านเภสัชกรรม เช่น ใช้ในการต่อต้านแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ เชื้อราและไวรัส ต่อต้านโรคหืด ป้องกันการเกิดออกซิเดชัน รักษาอาการเจ็บปวด ป้องกันโรคความดันโลหิตสูง เป็นต้น (Moorthy และคณะ 2006) จากรายงานต่างๆ เหล่านี้สังเกตได้ว่า สารฟลาโวนอยด์น่าจะมีประสิทธิภาพสูงในการปกป้องพืชและมนุษย์ การเลือกใช้กลไกทางธรรมชาติมาต่อต้านเชื้อโรค โดยเฉพาะสารกลุ่ม ฟลาโวนอยด์เป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไปและมีรายงานการสะสมสารตอบสนองต่อโรคในพืช และการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคในพืชหลายชนิด เช่น การนำสารฟลาวาโนนและสารโพลีเมทอกซีฟลาโวน (polymethoxyflavones) ที่พบมากในเปลือกของผลส้มเกรพฟรุท (*Citrus paradisi*) และสวิตทอเรนซ์ (*Citrus sinensis*) ได้แก่ นารินจิน (naringin) และเฮสเพอริดีน (hesperidin) มาใช้ในการต่อต้านเชื้อรา *Penicillium digitatum* เป็นเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคเน่าในพืชตระกูลส้มหลังจากการเก็บเกี่ยวและยังมีการใช้ไฟโตอะแลกซิน (phytoalexins) ในพืชตระกูลส้มบางชนิด (Del Rio และคณะ 2004) และมีการศึกษาในพืชพวงแตงกวา (*Cucumis sativus*) ซึ่งใช้เอนไซม์แซลโคเนซินเทส (chalcone synthase, CHS) จากชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ ชักนำให้ผลิตไฟโตอะแลกซินที่มีผลในการต่อต้านเชื้อรา *Podosphaera xanthii* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคราแป้ง (powdery mildew) ในแตงกวา (Fofana และคณะ 2005)

เนื่องจากในธรรมชาติพืชจะสามารถผลิตสารฟลาโวนอยด์ได้ไม่สูงมากนัก เนื่องจากกลไกการควบคุมทางเมแทบอลิซึมภายใน ดังนั้นการศึกษากลไกการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคอาจไม่ชัดเจน อีกทั้งสายพันธุ์พืชจากธรรมชาติที่แตกต่างกันอาจมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการทดลอง ในการทดลองนี้จึงใช้พืชตัดต่อพันธุกรรมที่เพิ่มการสะสมสารฟลาโวนอยด์สำหรับเป็นพืชทดสอบแทนพืชเศรษฐกิจชนิดอื่นในสภาพควบคุม เพื่อให้ได้องค์ความรู้ที่ถูกต้องและชัดเจนสำหรับการประยุกต์ใช้กับพืชเศรษฐกิจต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1. เพื่อทำการศึกษาถึงการต้านทานต่อสภาวะการติดเชื้อโรคพืช ภายในต้นยาสูบปกติและต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรม โดยศึกษาจากการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาในสภาวะห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1.2.2. เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ของการสะสมกลุ่มฟินอลิกและ สารกลุ่มฟลโวนอยด์ที่มีผลต่อสภาวะการติดเชื้อโรคพืชในของต้นยาสูบปกติและต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรม

1.2.3. เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการสะสมสารต่างๆ ที่มีผลต่อการต้านทานต่อสภาวะการติดเชื้อโรคพืช

1.2.4. เพื่อนำองค์ความรู้ที่ได้เป็นแนวทาง สำหรับแนะนำการตัดสายพันธุ์พืชเศรษฐกิจ ให้กับเกษตรกรในช่วงฤดูการระบาดของโรคพืช

1.2.5. เพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มผลผลิตจากสินค้าทางการเกษตร

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ในการวิจัยนี้จะทำการเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนต้นยาสูบปกติและต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมที่มีการถ่ายโอนยีนที่ rate limiting step ในวิถีชีวสังเคราะห์ฟลโวนอยด์ (FR plant) และยีนที่เพิ่มหมู่ไฮดรอกซีกับฟลโวนอยด์ (FH plant) แล้วนำไปทดสอบกับเชื้อรา *Rhizopus* sp. และ *Sclerotium rolfisii* ซึ่งก่อให้เกิดโรคในพืช และทำการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของต้นยาสูบปกติและต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรม โดยศึกษาจากการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา การเข้าทำลายของเชื้อ รวมถึงการศึกษากการสร้างและการสะสมรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสง สารประกอบกลุ่มฟินอลิกและสารกลุ่มฟลโวนอยด์ ต่อบนของเชื้อโรคดังกล่าว

## 1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

สร้างพืชตัดแปลงพันธุกรรมและใช้ทดสอบเชื้อในห้องปฏิบัติการ

## 1.5 สมมุติฐานงานวิจัย

เนื่องจากปัญหาจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคพืชส่งผลกระทบต่อการผลิตของพืช รวมทั้งปริมาณผลผลิตจากพืชต่าง ๆ เหล่านั้น ส่งผลกระทบต่อความเสียหายของเศรษฐกิจประเทศไทยมูลค่ามหาศาล นอกจากนี้สิ่งแวดล้อมที่แปรปรวนมีผลให้การระบาดของโรครุนแรงขึ้น ไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมเป็นหลักจึงได้รับผลกระทบอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ การส่งเสริมความแข็งแรงของพืชต่อสิ่งแวดล้อมโดยใช้สารจากพืชเองจึงน่าจะเป็นแนวทางที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม รวมทั้งลดการขาดดุลจากนำเข้าสารเคมีต่างๆ จากการศึกษาพบว่า การสร้างและการสะสมสารต่าง ๆ ภายในวิถีชีวสังเคราะห์ฟลโวนอยด์นั้นมีผลต่อการต้านทานต่อสภาวะเครียดทางชีวภาพภายในต้นพืชที่แตกต่างกันออกไป ดังนั้นการศึกษาศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงทางด้านการเจริญเติบโต ทางด้านสรีรวิทยา การเข้าทำลายเซลล์ของเชื้อโรคพืช ร่วมกับการสร้าง

และการสะสมสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ภายใต้สภาวะที่ได้รับการติดเชื้อโรคพืชในต้นยาสูบที่มีการถ่ายโอนยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ จึงน่าจะนำไปสู่การเข้าใจถึงกลไกและความสำคัญของสารต่าง ๆ ที่มีผลต่อการต้านทานตัวเองของต้นพืชต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคพืชต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี ซึ่งจะส่งผลต่อการนำไปประยุกต์ใช้กับพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจสายพันธุ์ต่าง ๆ ในอนาคตต่อไปได้

### 1.6 กรอบแนวคิด

เนื่องจากปัญหาจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคพืชส่งผลกระทบต่อการผลิตเจริญเติบโตของพืช รวมทั้งปริมาณผลผลิตจากพืชต่าง ๆ เหล่านี้ ส่งผลต่อความเสียหายของเศรษฐกิจประเทศไทยมูลค่ามหาศาล นอกจากนี้สิ่งแวดล้อมที่แปรปรวนมีผลให้การระบาดของโรครุนแรงขึ้น ไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมเป็นหลักจึงได้รับผลกระทบอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ การส่งเสริมความแข็งแรงของพืชต่อสิ่งแวดล้อมโดยใช้สารจากพืชเองจึงน่าจะเป็นแนวทางที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม รวมทั้งลดการขาดดุลจากนำเข้าสารเคมีต่าง ๆ จากการศึกษาพบว่าการสร้างและการสะสมสารต่าง ๆ ภายในวิถีชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์นั้นมีผลต่อการต้านทานต่อสภาวะเครียดทางชีวภาพภายในต้นพืชที่แตกต่างกันออกไป ดังนั้นการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงทางด้านการเจริญเติบโต ทางด้านสรีรวิทยา การเข้าทำลายเซลล์ของเชื้อโรคพืช ร่วมกับการสร้างและการสะสมสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ภายใต้สภาวะที่ได้รับการติดเชื้อโรคพืชในต้นยาสูบที่มีการถ่ายโอนยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ จึงน่าจะนำไปสู่การเข้าใจถึงกลไกและความสำคัญของสารต่าง ๆ ที่มีผลต่อการต้านทานตัวเองของต้นพืชต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคพืชต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี ซึ่งจะส่งผลต่อการนำไปประยุกต์ใช้กับพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจสายพันธุ์ต่าง ๆ ในอนาคตต่อไปได้

### 1.7 คำสำคัญของการวิจัย

เฟลโวนอยด์ พืชดัดแปลงพันธุกรรม *Rhizopus sp. Sclerotium rolfsii*

### 1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับและหน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- 1.8.1 สามารถเข้าใจถึงการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยาและการเข้าทำลายของโรคต่อพืชตัวอย่าง
- 1.8.2 สามารถเข้าใจถึงวิถีชีวสังเคราะห์ของสารต่าง ๆ ที่มีผลต่อการต้านทานการถูกทำลายด้วยเชื้อโรค
- 1.8.3 สามารถใช้สารเมแทบอไลต์ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการถูกทำลายด้วยเชื้อโรคพืชในการคัดเลือกพืชชนิดอื่นที่การต้านทานต่อสภาวะเครียดนี้ได้
- 1.8.4 สามารถใช้เป็นแนวทางในการสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมชนิดอื่นให้สามารถต้านทานต่อการถูกทำลายด้วยเชื้อโรคพืชได้
- 1.8.5 สามารถนำความรู้และความเข้าใจที่ได้มาเป็นแนวทางแก้ไขปัญหาที่เกิดจากสภาพแวดล้อมในพื้นที่เพาะปลูกได้
- 1.8.6 การนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการจำนวน 1 เรื่อง

## บทที่ 2

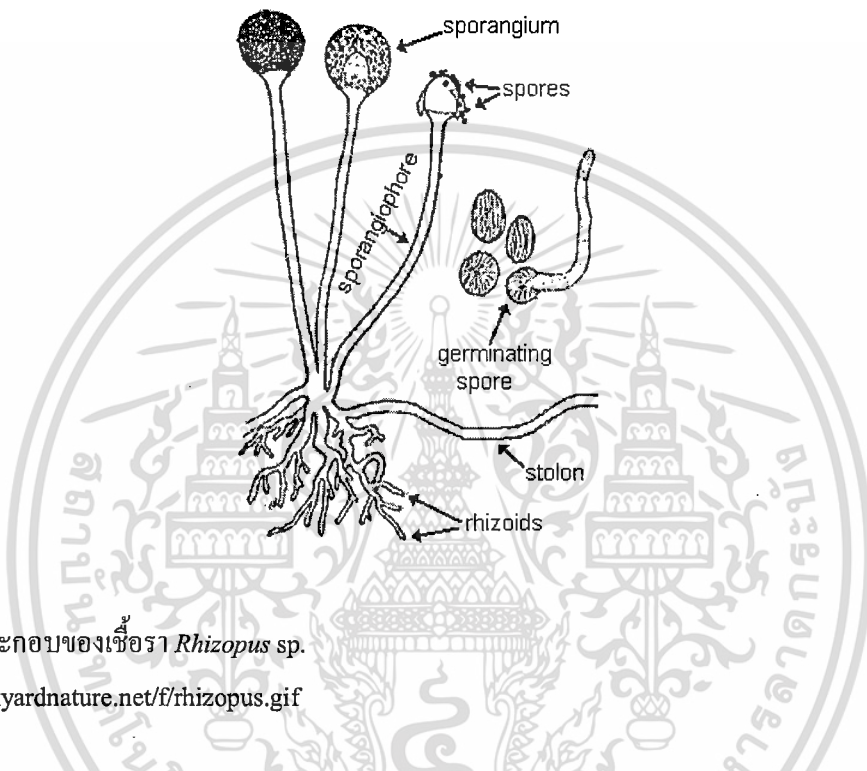
### แนวคิดและทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 แนวคิดทฤษฎีหลัก

ผลจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมทางชีวภาพหรือสภาวะเครียดทางชีวภาพ (biotic stress) โดยเฉพาะที่เกิดจากเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคพืช (Gustafson และ Casper, 2004) ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยาและการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ ภายในต้นพืชที่อยู่ภายใต้สภาวะเครียดดังกล่าว (Pinior และคณะ 2005) เริ่มจากการถูกเข้าทำลายของพืชจากเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรค ซึ่งเกิดจากการที่ส่วนใดส่วนหนึ่งของเชื้อราโดยส่วนใหญ่จะเป็นสปอร์เข้าไปสัมผัสกับพืช นำไปสู่การงอกของเส้นใยและเข้าไปภายในเซลล์พืชตามส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น บริเวณบาดแผล บริเวณปากใบหรือการเข้าสู่เซลล์พืชโดยตรงทางชั้นคิวติเคิล (cuticle) (Markovich และ Kononova, 2003) ส่งผลให้เกิดการส่งสัญญาณโมเลกุลที่อยู่ภายในเซลล์พืช ทำให้เกิดการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการเข้าทำลายจากเชื้อโรคพืช โดยที่จะเกิดความแตกต่างกันระหว่างชนิดและสายพันธุ์ของพืชที่ได้รับผลกระทบจากเชื้อโรคพืชดังกล่าว การที่เชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคนั้นส่งผลต่อการเจริญเติบโต และปริมาณการสร้างผลผลิตของพืชนั้น เกิดจากการที่เชื้อราเมื่อเข้าสู่เซลล์พืชแล้วจะมีการใช้อาหารที่อยู่ภายในเซลล์พืชเพื่อการเจริญเติบโต และการขยายพันธุ์ของเชื้อรา เป็นเหตุให้พืชนั้นเกิดการขาดสารอาหารต่าง ๆ ได้และเกิดจากการที่เชื้อราที่ก่อโรคนั้นมีการหลั่งสารหรือเอนไซม์ต่างๆ ที่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือวิถีชีวสังเคราะห์สารต่าง ๆ ภายในเซลล์พืช ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อราต่าง ๆ เหล่านี้อาจจะทำลายเซลล์พืชโดยตรงหรือมีอิทธิพลกับกลไกที่ควบคุมขบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ในเซลล์ (Fiehn และคณะ 2007)

เชื้อรา *Rhizopus* sp. จัดอยู่ในจำพวก *Rhizopus* มีประมาณ 14 สปีชีส์ เป็นเชื้อราที่พบทั่วไปในดินและฝุ่นผงในบ้านและพบบ่อยในเครื่องปรับอากาศ เป็นสาเหตุของโรคเน่าและของหัวมันเทศตลอดจนผลไม้ต่างๆ บางพวกเป็นสาเหตุของโรคไซโกไมยโคซิส (zygomycosis) ของคนและสัตว์บางชนิด โรคที่เกิดจากเชื้อราชนิดนี้ เช่น โรค *Rhizopus solf rot* ในผลไม้ พบได้ทั่วไปกับผัก ผลไม้ ไม้ดอก หลังการเกี่ยวเก็บแล้ว ซึ่งอาจอยู่ในระหว่างการขนส่ง เก็บรักษาและวางจำหน่าย เช่น มันเทศ สตรอเบอร์รี่ ท้อ แดง ถั่ว อากาศของโรคนี้ เนื้อของส่วนที่เป็นโรคช้ำ ชุ่มน้ำ ต่อมาความชื้นจะระเหยออกไปที่ละน้อย จนผิวหดย่น หากส่วนที่เป็นโรคที่ชุ่มน้ำนั้นอยู่ระหว่างการขนส่ง ผิวอาจแตกและมีน้ำไหลออก สีขาวถึงเหลือง เชื้อราจะเจริญออกมาทางบาดแผล มีสปอร์แรงจีโอฟอร์สเทคูลุม และเกิดสปอร์แรงจีโอฟอร์สที่ปลิว การเจริญของเชื้อรานี้อาจลุกลามไปยังผิวของหีบห่อที่ใช้บรรจุ และสัมผัสกับส่วนของพืชที่เป็นโรคได้เนื้อเยื่อของพืชที่เป็นโรคนี้อาจส่งกลิ่นเหม็นเนื่องจากมียีสต์และแบคทีเรียต่างๆ เข้าทำลายซ้ำเติม โรค *Rhizopus solf rot* ในมันเทศ เชื้อโรคจะเข้าสู่พืชทาง

รากอ่อน แล้วจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เมื่อมีสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญและเมื่อเข้าสู่รากแล้วจะเจริญเร็วแล้วทำลายรากโดยใช้เวลาเพียงเล็กน้อย หลังจากนั้นก็เริ่มทำลายหัวมันเทศจนเน่าและ นอกจากนี้ยีสสามารถพบเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในหัวบีทและต้นยาสูบ โดยการเข้าไปกระทำทางรากของเชื้อรา *R. arrhizus* (ไพโรจน์, 2525)

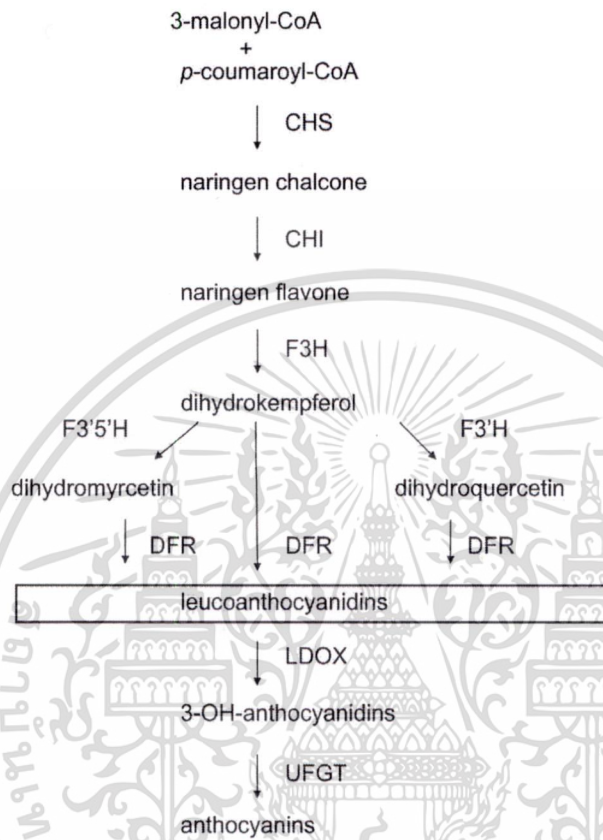


รูปที่ 2.1 ส่วนประกอบของเชื้อรา *Rhizopus* sp.

ที่มา : [www.backyardnature.net/f/rhizopus.gif](http://www.backyardnature.net/f/rhizopus.gif)

เชื้อรา *Sclerotium rolfsii* เป็นเชื้อราที่พบในดินทำให้เกิด โรคเน่า (blight) พบแพร่หลายในการเกษตรและการปลูกพืชสวน พืชผล วัชพืชและป่าไม้ เป็นเชื้อราที่มีการแพร่กระจายไปทั่วโลก และยังเป็นสาเหตุของโรค damping off ของกล้าพืช โรคเน่าและโคนเน่าของพืชหลายชนิด *S. rolfsii* เริ่มเข้าสู่โฮสต์ (host) ทางลำต้นและส่วนของพืช ได้แก่ ราก ผล ก้านใบ ใบและดอกที่สัมผัสกับดิน อาการเริ่มแรกเมื่อเชื้อเข้าไปจะมีสีน้ำตาลดำบริเวณขอบบาดแผล ลักษณะแรกที่สังเกตเห็นได้ชัด คือ ใบพืชมีสีเหลืองเข้มมากขึ้นและต่อมาก็เหี่ยวแห้ง ซึ่งลักษณะนี้เกิดจากเชื้อราที่มีการผลิตเส้นใยสีขาวอย่างสมบูรณ์ ในเชื้อเยื่อและดินที่เชื้อเข้าไปจะพบไมซีเลียมีลักษณะเป็นปุยเบาและนุ่ม การผลิตไมซีเลียมจะสัมพันธ์กับขนาดของสเคอโรเทียที่มีลักษณะค่อนข้างกลม สีขาวเมื่อยังไม่แก่และกลายเป็นสีน้ำตาลดำถึงดำเมื่อแก่ เชื้อรานี้จะผลิตสปอร์ที่เรียกว่า เบสิดิโอสปอร์ (basidiospores) ในระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ซึ่งจะไม่ค่อยพบในบริเวณขอบบาดแผลที่เปียก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 2.3** แสดงชีวสังเคราะห์ฟเลโวนอยด์ในอะราบิดอปซิส CHS; chalcone synthase, CHI; chalcone isomerase, F3H; flavanone 3-hydroxylase, F3'H; flavonoid 3'-hydroxylase, F3'5'H; flavonoid 3',5'-hydroxylase, DFR; dihydroflavonol 4-reductase, LDOX; leucoanthocyanidin dioxygenase, UFGT; UDPG flavonoid glucosyl transferase

ที่มา : [www.biomedcentral.com](http://www.biomedcentral.com)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสารกลุ่มฟเลโวนอยด์หลายชนิดในเซลล์พืช น่าจะมีความสำคัญต่อการต้านทานต่อเชื้อโรคพืชได้ จากการศึกษาการสะสมสารกลุ่มฟเลโวนอยด์ตอบสนองต่อความเครียดทางชีวภาพที่เกิดจากเชื้อโรคพืชร่วมกับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของต้นต้นยาสูบปกติ และต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม น่าจะมีส่วนสำคัญต่อการจำแนกชนิดสารที่เพิ่มประสิทธิภาพการต้านทานต่อสภาวะเครียดดังกล่าว รวมทั้งการนำความรู้ที่ได้นำไปประยุกต์ใช้กับพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจให้ต้านทานต่อสภาวะเครียดดังกล่าวได้

131160

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

##### 3.1 การเตรียมต้นยาสูบและการทดสอบสภาวะการติดเชื้อโรคพืช

ทำการเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนต้นยาสูบปกติและต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่มีการถ่ายโอนยีนที่ rate limiting step ในวิถีชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (FR plant) และยีนที่เพิ่มหมู่ไฮดรอกซีกับเฟลโวนอยด์ (FH plant) ในอาหาร MS ในสภาวะห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส ที่ความเข้มแสง 800 ลักซ์ (luxs) เป็นเวลา 14 วัน นำต้นยาสูบปกติและต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันมาทดสอบกับเชื้อโรคพืช

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus* sp. และเชื้อรา *Sclerotium rolfii* ในอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และนำเชื้อราที่เจริญเติบโตเต็มที่มาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้มีปริมาณเชื้อเท่ากับ  $10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วทำการฉีดเข้าที่บริเวณโคนต้นของต้นพืชทดลอง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำต้นยาสูบที่ได้รับเชื้อไปเพาะเลี้ยงปกติในสภาวะห้องเพาะเลี้ยงเนื้อพืช จนครบ 7 วัน แล้วตรวจสอบผลการตอบสนองของต้นยาสูบปกติและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนกับเชื้อโรคพืช นำตัวอย่างที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $-80$  องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการทดลองต่อไป

##### 3.2. ตรวจสอบด้วยการสังเกตทางสรีรวิทยาของต้นและใบยาสูบ

ทำการสังเกตลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นยาสูบปกติและต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ทดสอบกับเชื้อโรคพืชแล้วเป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับต้นยาสูบปกติและต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ไม่มีการบุกรุกของเชื้อ

##### 3.3. ตรวจสอบการทำลายของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ทำการสังเกตลักษณะของใบของต้นยาสูบปกติและต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ทดสอบกับเชื้อโรคพืชแล้วเป็นเวลา 7 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบกับต้นยาสูบปกติและต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ไม่มีการบุกรุกของเชื้อโรคพืชดังกล่าว

##### 3.4. ตรวจสอบปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง

นำใบของต้นยาสูบปกติและต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ทดสอบกับเชื้อโรคพืชแล้วเป็นเวลา 7 วัน มาบดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วเติมอะซิโตน (acetone) ที่  $-20^{\circ}\text{C}$  ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำส่วนในสีที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 662 644 และ 470 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาคำนวณเพื่อหาค่าคลอโรฟิลล์เอ (chlorophyll A;  $\text{Ch}_a$ ) คลอโรฟิลล์บี (chlorophyll B;  $\text{Ch}_b$ ) และคาโรทีนอยด์

(carotenoid; Car) ในหน่วยไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ( $\mu\text{g/g F.W.}$ ) (Shabala *et al.*, 1999) เปรียบเทียบกับ ต้นยาสูบปกติและต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมควบคุมที่ไม่มีการบุกรุกของเชื้อ

### 3.5. ตรวจสอบการผลิตสารประกอบฟีนอลิกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

นำใบของต้นยาสูบปกติและต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมที่ทดสอบกับเชื้อโรคพืชแล้วเป็นเวลา 7 วัน มาดูการผลิตสารประกอบฟีนอลิก โดยดูที่บริเวณที่มีการบุกรุกของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Nikon eclipse 80i: exciter filter 450-490 nm, dichroic mirror 505 nm, barrier filter 520 nm) ที่กำลังขยาย 100x เปรียบเทียบกับต้นยาสูบปกติและต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมควบคุมที่ไม่มีการบุกรุกของเชื้อ

### 3.6. การสะสมสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ ภายใต้สภาวะเครียด

นำต้นยาสูบปกติและต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมที่ทดสอบกับเชื้อโรคพืชแล้วเป็นเวลา 7 วัน มาบดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วสกัดด้วยสารละลายผสมที่มีเมทานอลกับกรดไฮโดรคลอริก (HCl) อัตราส่วน 99:1 ตามวิธีของ Harborne (1998) โดยทำการผสมสารสกัดกับน้ำอัตราส่วน 3:2 เติมนลงในต้นกล้าข้าวที่บดแล้ว ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการเติม คลอโรฟอร์ม (chloroform) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นของสารกลุ่มเฟลโวนอยด์แต่ละชนิด ค่าที่ได้จะแสดงในหน่วยค่าการดูดกลืนแสงต่อกรัมน้ำหนักสด (absorbance/g F.W.) เปรียบเทียบกับต้นยาสูบปกติและต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมควบคุมที่ไม่มีการบุกรุกของเชื้อ

### 3.7. การออกแบบทางสถิติ

ทำการทดลอง 5 ซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง ( $n = 5$ ) ออกแบบการทดลองโดยใช้ CRD ผลที่ได้นำไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วย ANOVA และ Duncan's multiple range test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 15.0 (SPSS for Windows, SPSS Inc., USA)

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 4.1 ผลของลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นยาสูบ

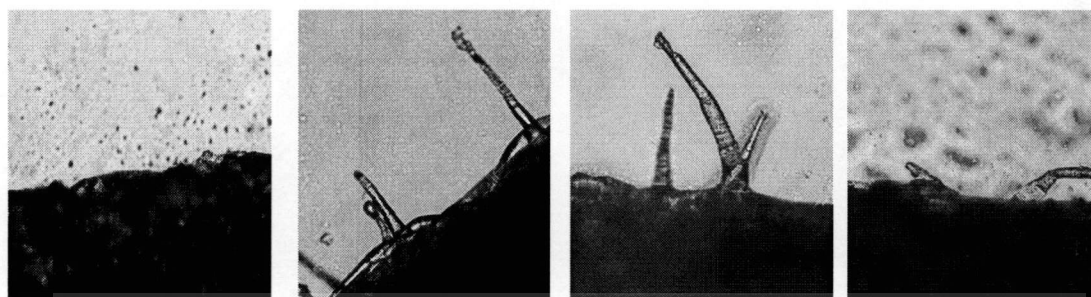
เมื่อตรวจสอบ ต้นยาสูบปรกติ และต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม FR และ FH ที่ได้รับเชื้อทดสอบ *Rhizopus* sp. และ *Sclerotium rolfii* เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่า ต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม FR และ FH มีใบเหลืองน้อยกว่า และลักษณะทางสรีรวิทยาที่ดีกว่าต้นยาสูบปรกติในทั้งสองชนิดของเชื้อที่ใช้ทดสอบ เชื้อ *Sclerotium rolfii* มีอัตราเจริญเติบโตเร็วกว่าเชื้อ *Rhizopus* sp. ต้นยาสูบที่ถูกบุกรุกด้วยเชื้อ ทดสอบ *Sclerotium rolfii* จึงมีลักษณะต้นค่อนข้างเหลืองมากกว่า

#### 4.2 ผลการทำลายของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

จากการสังเกตการณ์เข้าทำลายใบของ ต้นยาสูบปรกติ และต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม FR และ FH ที่ได้ถูกบุกรุกด้วยเชื้อ ทดสอบ *Rhizopus* sp. และ *Sclerotium rolfii* เป็นระยะเวลา 7 วัน ได้ดังรูปที่ 4.1 และรูปที่ 4.2 เปรียบเทียบกับต้นยาสูบปรกติพบว่า พบว่า ใบของต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม FR และ FH ติดเชื้อทั้งสองชนิดน้อยกว่าใบจากต้นยาสูบปรกติ โดยใบของต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม FH ติดเชื้อน้อยกว่า ใบของต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม FR เล็กน้อย

#### 4.3 ผลของปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง

จากการนำใบของ ต้นยาสูบปรกติ และต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม FR และ FH ที่ได้ถูกบุกรุกด้วยเชื้อ ทดสอบ *Rhizopus* sp. และ *Sclerotium rolfii* เป็นระยะเวลา 7 วัน มาสกัดรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง และนำสารสกัดมาตรวจสอบและคำนวณค่ารงควัตถุดังกล่าว เปรียบเทียบกับต้นยาสูบที่ไม่ได้รับเชื้อ จะได้ผลดังตารางที่ 4.1 จากการทดลองพบว่า พบว่า ปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงในต้นยาสูบทั้ง 3 ชนิดที่ไม่ติดเชื้อพบว่า มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อนำต้นยาสูบทั้ง 3 ชนิดมาทดสอบกับเชื้อ *Rhizopus* sp. จะพบว่าในต้นยาสูบ FH ที่ติดเชื้อมีปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงทั้ง 3 ชนิด เพิ่มขึ้นจากต้นยาสูบที่มีเชื้อ FH ที่ไม่ติดเชื้อและมีค่าแตกต่างทางสถิติกัน ต้นยาสูบ FR ที่ติดเชื้อจะมีปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงไม่แตกต่างจากต้นยาสูบ FH ที่ไม่ติดเชื้อ ส่วนในต้นยาสูบปรกติพบว่ามีต้นที่ติดเชื้อมีปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงลดลงมากที่สุดและมีค่าแตกต่างทางสถิติกัน จากผลการทดสอบการเข้าทำลายของเชื้อ *S. rolfii* ซึ่งสามารถเข้าทำลายพืชได้เร็วกว่าเชื้อ *Rhizopus* sp. ส่งผลให้ปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงของใบต้นยาสูบปรกติลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อได้รับเชื้อ *S. rolfii* ส่วนปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงของใบต้นยาสูบ FR และ FH ไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก



(ก)

(ข)

(ค)

(ง)

**รูปที่ 4.1** แสดงผลการตรวจสอบลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อ *Rhizopus* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (100x) รูป (ก) คือ ภาพของต้นยาสูบที่ไม่ได้รับเชื้อ รูป (ข) (ค) และ (ง) คือ ภาพของต้นยาสูบปกติ FR และ FH ที่ติดเชื้อ *Rhizopus* sp. ตามลำดับ



(ก)

(ข)

(ค)

(ง)

**รูปที่ 4.2** แสดงผลการตรวจสอบลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (100x) รูป (ก) คือ ภาพของต้นยาสูบที่ไม่ติดเชื้อ รูป (ข) (ค) และ (ง) คือ ภาพของต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบ FR และ FH ที่ติดเชื้อ *S. rolfsii* ตามลำดับ

#### 4.4 ผลการตรวจสอบสารประกอบฟีนอลิกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

จากการนำใบของ ต้นยาสูบปกติ และต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรม FR และ FH ที่ได้ถูกบดด้วยเชื้อ ทดสอบ *Rhizopus* sp. และ *Sclerotium rolfsii* มาตรวจสอบสารประกอบฟีนอลิกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์พบว่าต้นยาสูบ FR และ FH ที่ติดเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ มีแนวโน้มในการผลิตสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าต้นยาสูบที่ไม่ติดเชื้อ และมีแนวโน้มในการผลิตสารประกอบฟีนอลิกได้สูงกว่าต้นยาสูบปกติ

#### 4.5 ผลการตรวจสอบการผลิตสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในต้นยาสูบภายใต้สภาวะเครียด

จากการนำใบของ ต้นยาสูบปกติ และต้นยาสูบ FR และ FH ที่ติดเชื้อ ทดสอบ *Rhizopus* sp. และ *Sclerotium rolfsii* มาสกัดสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์ จากการทดลอง พบว่า ต้นยาสูบปกติที่ติดเชื้อ

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณรงควัตถุจากสารสกัดจากใบของยาสูบปรกติ ยาสูบFR และ FH (ไมโครกรัม/กรัม) ในสถานะที่ได้รับ และไม่ได้รับเชื้อ *Rhizopus* sp. หรือ เชื้อ *Sclerotium rolfsii*

รงควัตถุ	ไม่ได้รับเชื้อ			รับเชื้อ <i>Rhizopus</i> sp		
	ยาสูบปรกติ	ยาสูบ FR	ยาสูบ FH	ยาสูบปรกติ	ยาสูบ FR	ยาสูบ FH
คลอโรฟิลล์เอ	632 <sup>b</sup>	633 <sup>b</sup>	639 <sup>b</sup>	559 <sup>c</sup>	617 <sup>b</sup>	656 <sup>a</sup>
คลอโรฟิลล์บี	209 <sup>b</sup>	210 <sup>b</sup>	212 <sup>b</sup>	175 <sup>c</sup>	202 <sup>b</sup>	239 <sup>a</sup>
คาร์โรทีนอยด์	185 <sup>b</sup>	183 <sup>b</sup>	186 <sup>b</sup>	166 <sup>c</sup>	181 <sup>b</sup>	200 <sup>a</sup>
	ไม่ได้รับเชื้อ			รับเชื้อ <i>Sclerotium rolfsii</i>		
คลอโรฟิลล์เอ	597 <sup>b</sup>	602 <sup>ab</sup>	597 <sup>b</sup>	287 <sup>c</sup>	576 <sup>b</sup>	627 <sup>a</sup>
คลอโรฟิลล์บี	220 <sup>a</sup>	214 <sup>a</sup>	212 <sup>a</sup>	103 <sup>b</sup>	217 <sup>a</sup>	227 <sup>a</sup>
คาร์โรทีนอยด์	171 <sup>b</sup>	175 <sup>ab</sup>	177 <sup>ab</sup>	78 <sup>c</sup>	170 <sup>b</sup>	189 <sup>a</sup>

\* ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 5 ซ้ำ เปรียบเทียบเฉพาะสาร ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยDMRT ( $p=0.05$ )

*Rhizopus* sp. มีแนวโน้มการผลิตสารในกลุ่มฟลาวอนอยด์เพิ่มขึ้นจากต้นยาสูบปรกติที่ไม่ติดเชื้อเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ต้นยาสูบ FR ที่ไม่ติดเชื้อมีสารกลุ่มฟลาวาโนน และฟลาวอน สูงกว่าต้นยาสูบปรกติที่ไม่ติดเชื้อ เมื่อต้นยาสูบ FR ติดเชื้อ *Rhizopus* sp. จะให้สารแทนนินและแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นจากต้นยาสูบที่ไม่ติดเชื้อ ต้นยาสูบ FH ที่ไม่ติดเชื้อ นอกจากจะมีสารกลุ่มฟลาวาโนนและฟลาวอนสูงกว่าต้นยาสูบปรกติที่ไม่ติดเชื้อ เช่นเดียวกับต้นยาสูบ FR แล้วยังมีสารกลุ่มฟลาวอนอลแทนนินและแอนโทไซยานิน สูงกว่าต้นยาสูบปรกติที่ไม่ติดเชื้อ เมื่อต้นยาสูบ FH ติดเชื้อ *Rhizopus* sp. จะมีการสะสมสารฟลาวอนอยด์ทุกกลุ่มเพิ่มขึ้นจากต้นยาสูบ FH ที่ไม่ติดเชื้อและต้นยาสูบปรกติที่ติดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อได้รับการติดเชื้อ *S. rolfsii* ต้นยาสูบทุกสายพันธุ์มีการสะสมสารฟลาวาโนน ฟลาวอนและฟลาวอนอลเพิ่มขึ้นทุกสายพันธุ์ ส่วนสารแทนนินและแอนโทไซยานินมีการเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก โดยต้นยาสูบ FH ให้ปริมาณการสะสมสารสูงที่สุดในสารทั้งสามชนิด (ฟลาวาโนน ฟลาวอนและฟลาวอนอล) รองลงมาได้แก่ ต้นยาสูบ FR และต่ำที่สุดในต้นยาสูบปรกติ ในต้นยาสูบ FH ที่ติดเชื้อมีการสะสมสารฟลาวอนอลเพิ่มขึ้นจากต้นยาสูบชนิดเดียวกันที่ไม่ได้รับเชื้ออย่างเด่นชัด ซึ่งคาดว่าอาจเป็นสารสำคัญที่มีส่วนช่วยในการปกป้องพืชจากเชื้อก่อโรค *S. rolfsii*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณเฟลโวนอยด์จากสารสกัดจากใบของยาสูบปรกติ ยาสูบ FR และ FH (absorbance/g FW) ในสถานะที่ไม่ติด และติดเชื้อ *Rhizopus* sp.

กลุ่มสาร	ชื่อสาร	ต้นยาสูบปรกติ		ต้นยาสูบ FR		ต้นยาสูบ FH	
		ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ
เฟลวาโนน	นาริจินิน	.482 <sup>c</sup>	.532 <sup>c</sup>	.689 <sup>b</sup>	.708 <sup>b</sup>	.707 <sup>b</sup>	.862 <sup>a</sup>
เฟลโวน	อะพิจินิน	.479 <sup>d</sup>	.516 <sup>cd</sup>	.590 <sup>bc</sup>	.639 <sup>b</sup>	.634 <sup>b</sup>	.895 <sup>a</sup>
เฟลโวนอล	เคอร์เซทีน	.655 <sup>b</sup>	.686 <sup>b</sup>	.665 <sup>b</sup>	.722 <sup>b</sup>	.664 <sup>b</sup>	.847 <sup>a</sup>
แทนนิน	แกลโลแทนนิน	.093 <sup>c</sup>	.097 <sup>bc</sup>	.094 <sup>c</sup>	.108 <sup>ab</sup>	.094 <sup>c</sup>	.114 <sup>a</sup>
แอนโทไซยานิน	ไซยานิดิน	.082 <sup>c</sup>	.093 <sup>bc</sup>	.093 <sup>bc</sup>	.110 <sup>a</sup>	.099 <sup>b</sup>	.114 <sup>a</sup>

\* ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 5 ซ้ำ เปรียบเทียบเฉพาะสาร ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยDMRT (p=0.05)

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณเฟลโวนอยด์จากสารสกัดจากใบของยาสูบปรกติ ยาสูบ FR และ FH ในสถานะที่ไม่ติด และติดเชื้อ *Sclerotium rolfsii*

กลุ่มสาร	ชื่อสาร	ต้นยาสูบปรกติ		ต้นยาสูบ FR		ต้นยาสูบ FH	
		ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ
เฟลวาโนน	นาริจินิน	.166 <sup>c</sup>	.542 <sup>a</sup>	.409 <sup>b</sup>	.588 <sup>a</sup>	.387 <sup>b</sup>	.599 <sup>a</sup>
เฟลโวน	อะพิจินิน	.126 <sup>c</sup>	.418 <sup>c</sup>	.136 <sup>c</sup>	.485 <sup>b</sup>	.287 <sup>d</sup>	.610 <sup>a</sup>
เฟลโวนอล	เคอร์เซทีน	.181 <sup>c</sup>	.424 <sup>c</sup>	.250 <sup>d</sup>	.596 <sup>b</sup>	.270 <sup>d</sup>	.801 <sup>a</sup>
แทนนิน	แกลโลแทนนิน	.032 <sup>d</sup>	.041 <sup>cd</sup>	.044 <sup>bcd</sup>	.050 <sup>ab</sup>	.047 <sup>bc</sup>	.056 <sup>a</sup>
แอนโทไซยานิน	ไซยานิดิน	.044 <sup>a</sup>	.046 <sup>a</sup>	.046 <sup>a</sup>	.055 <sup>a</sup>	.060 <sup>a</sup>	.063 <sup>a</sup>

\* ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 5 ซ้ำ เปรียบเทียบเฉพาะสาร ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยDMRT (p=0.05)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลวิจารณ์และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

ต้นยาสูบ FR และ FH จะมีการผลิตสารประกอบฟีนอลิกและฟเลโวนอยด์ในปริมาณที่สูงกว่าต้นยาสูบปกติ โดยเฉพาะในสภาวะที่ติดเชื้อ *Rhizopus* sp. และ *S. rolfsii* ต้นยาสูบ FH มีการผลิตสารฟเลโวนอยด์มากที่สุด รองลงมาคือต้นยาสูบ FR และต้นยาสูบปกติที่มีการผลิตน้อยที่สุด และจากการทดลองนี้คาดว่า สารกลุ่มฟเลโวนอยด์ โดยเฉพาะสารที่ได้จากต้นชีวสังเคราะห์ฟเลโวนอยด์ น่าจะมีส่วนสำคัญในการปกป้องพืชจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Rhizopus* sp. และ *S. rolfsii* เนื่องจากมีอัตราการสังเคราะห์สารเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และพบว่าปริมาณสารมีความสัมพันธ์กับลักษณะความแข็งแรงของต้นยาสูบ โดยต้นยาสูบ FR และ FH มี ใบเหลืองน้อยกว่า และลักษณะทางสรีรวิทยาที่ดีกว่าต้นยาสูบปกติ และยังคงรักษาปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงได้ดีกว่า ต้นยาสูบสายพันธุ์ปกติ แต่สารที่ได้จากปลายชีวสังเคราะห์ฟเลโวนอยด์ (แทนนินและแอนโทไซยานิน) ในต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ติดเชื้อจะมีการเพิ่มขึ้นจากต้นไม่ติดเชื้ออย่างไม่แตกต่างกันทางสถิติ จึงคาดว่าอาจไม่มีผลโดยตรงต่อการปกป้องพืชต่อเชื้อทั้งสองชนิด ดังนั้นการปริมาณสารฟเลโวนอยด์ที่ผลิตได้จากต้นชีวสังเคราะห์ในปริมาณสูงน่าจะถึงความสามารถสูงในการต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *Rhizopus* sp. และ *S. rolfsii*

#### 5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการทดลองนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติม ในการจำแนกชนิดสารที่มีผลจำเพาะในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทั้งสองด้วยเทคนิคขั้นสูง เพื่อให้ทราบชนิดสารที่ออกฤทธิ์แน่นอน สำหรับการออกการพัฒนาสายพันธุ์พืชหรือการผลิตสารเพื่อการค้าต่อไป

### บรรณานุกรม/เอกสารอ้างอิง

- ไพโรจน์ จ้วงพานิช. 2525. หลักวิชาการโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช. คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Del Rio, J.A., Gomez, P., Baidez, A.G., Arcar, M.C., Botia, J.M. and Ortuno, A. 2004. "Changes in the levels of polymethoxyflavones and flavanones as part of the defense mechanism of *Citrus sinensis* (cv. valencia late) fruits against *Phytophthora citrophthora*." **J. Agri. Food Chem.**, 52: 1913-1917.
- Fiehn, O., Sumner, L.W., Rhee, S.Y., Ward, J., Dickerson, J., Lange, B.M., Lane, G., Roessner, U., Last, R. and Nikolau, B. 2007. "Minimum reporting standards for plant biology context information in metabolomic studies." **Metabolomics**, 3: 195-201.
- Flores-Moctezuma, H.E., Montes-Belmont, R., Jimenez-Perez, A. and Nava-Juarez, R. 2006. "Pathogenic diversity of *Sclerotium rolfsii* isolates from Mexico, and potential control of southern blight through solarization and organic amendments." **Crop Protection**, 25: 195-201.
- Fofana, B., Benhamou, N., McNally, D.J., Labbe, C., Seguin, A. and Belanger, R.R. 2005. "Suppression of induced resistance in cucumber through disruption of the flavonoid pathway." **Biochem. Cell Biol.**, 95: 114-123.
- Grayer, R.J. and Kokubun, T. 2001. "Plant-fungal interaction: the search for phytoalexins and other antifungal compound from higher plants." **Phytochemistry**, 56: 253-263.
- Gustafson, D.J. and Casper, B.B. 2004. "Nutrient addition affects AM fungal performance and expression of plant/fungal feedback in three serpentine grasses." **Plant Soil**, 259: 9-17.
- Harborne, J.B. 1998. "Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis." London: Chapman & Hall.
- Harborne, J.B. and William, C.A. 1992. "Advances in flavonoid research since." **Phytochemistry**, 55: 481-504.
- Li, B., Fu, T., Dongyan, Y., Mikovits, J. A., Ruscetti, F. and Wang, J. 2000. "Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry." **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 276: 534-548.
- Lo, S., Janyce, A., Connie, B., Karl, V. W. and Ralph, L. N. 1998. "MALDITOF analysis of mixture of 3-deoxyanthocyanidin and anthocyanidin." **Phytochemistry**, 48: 1063-1066.

- Markovich, N.A. and Kononova, G.L. 2003. "Lytic enzymes of *Trichoderma* and their role in plant defense from fungal diseases: a review." **App. Biochem. Micro.**, 39: 341-351.
- Martens, S. and Mithofer, A. 2005. "Flavones and flavone synthases." **Phytochemistry**, 66: 2399-2409.
- Moorthy, N.S.H.N., Singh, R.J., Singh, H.P. and Gupta, S.D. 2006. "Synthesis, biological evaluation and *in silico* metabolic and toxicity prediction of some flavanone derivatives." **Chem. Pharm. Bull**, 25: 1384-1390.
- Pinior, A., Grunewaldt-Stöcker, G., Von Alten, H. and Strasser, R.J. 2005. "Mycorrhizal impact on drought stress tolerance of rose plants probed by chlorophyll a fluorescence, proline content and visual scoring." **Mycorrhiza**, 15: 596-605.
- Schijlen, E.G.W.M., Ric de Vos, C.H., van Tunen, A.J. and Bovy, A.G. 2004. "Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants." **Phytochemistry**, 65: 2631-2648.
- Shabala, S.N., Shabala, S.I., Martynenko, A.I., Babourina, O. and Newman, I.A. 1999. "Salinity effect on bioelectric activity, growth, Na<sup>+</sup> accumulation and chlorophyll fluorescence of maize leaves: A comparative survey and prospect for screenings." **Aust. J. plant Physiol.**, 25: 609-616.
- Skadhauge, B., Thomsen, K., and Wettstein, V.D. 1997. "The role of barley testa layer and its flavonoid content in resistance to *Fusarium* infection." **Phytochemistry**, 64: 21-30.

## ประวัตินักวิจัย

### ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล กนกพร สมพรไพลิน ตำแหน่งปัจจุบัน ผศ

### ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ
B Sc	Agriculture Technology	KMITL
M Sc	Biotechnology	Chulalongkorn University
Doctor of Pharmaceutical Sciences	Molecular Biology and Biotechnology	Chiba University (Japan)

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

Metabolic Engineering and Functional Genomics

Analysis techniques to evaluate antioxidants

Analysis of plant metabolisms

Plant Physiology

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับชาติและนานาชาติ) และการเสนอผลงานวิชาการ (ระยะเวลา 5 ปี)

1. K. Sompornpailin, O. Pakdee and P. Pumpuk. High Antioxidant Flavonoids Accumulated in Transgenic Tobacco Overexpressing Flavonoid Biosynthetic cDNA Response to Light Sources. The Second International Conference on Science and Technology for Sustainable Development of the Great Mekong Sub-region, Hanoi, Vietnam, 2008 O-39. oral presentation.
2. S. Chutipaijit, S. Cha-um and K. Sompornpailin. Osmoprotectant and Antioxidant Accumulation of in *Indica* Rice (*Oryza sativa* L. cv. *Indica*) Elevated Salt Stress Tolerance. The Second International Conference on Science and Technology for Sustainable Development of the Great Mekong Sub-region, Hanoi, Vietnam, 2008 P-56.
3. K. Sompornpailin and S. Kanthang. Identification of High Flavonoid Expression in Transgenic Tobacco Overexpressing *TT8* Gene Using Black Light. 34<sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand. Bangkok Thailand, 2008. B4\_B0075

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. S. Chutipaijit, S. Cha-um and K. Sompornpailin. Alteration of Proline and Anthocyanin Levels Affects Salinity Tolerance in *Indica* Rice Seedlings. 34<sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand. Bangkok Thailand, 2008. G\_G0006
5. C. Khunchuay, W. Phuwiwat and K. Sompornpailin. Additional Supplementation of Proline and Glutamine Effects on Callus Induction and Plant Regeneration in Vetiveria Grass. 34<sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand. Bangkok Thailand, 2008. G\_G0013
6. K. Sompornpailin, O. Pakdee and S. Kanthang. Metabolic Engineering of Transgenic Tobacco with *TT8* cDNA Accumulated High Flavonoid Contents. International Conference on Life Sciences; BioAsia 2008, Bangkok Thailand. 2008
7. S. Chutipaijit, S. Cha-um and K. Sompornpailin. Impact of proline accumulation on physiological response in *indica* rice genotypes (*Oryza sativa* L.) exposed to salt and drought stresses. . International Conference on Life Sciences; BioAsia 2008, Bangkok Thailand. 2008
8. K. Sompornpailin, S. Chutipaijit and S. Cha-um. Influence of Salinity and Drought Stresses on Physiological Characteristic and Proline Synthesis of Thai Rice Cultivars (*Oryza sativa* L. spp. *indica*) J. Science-Ladkrabang. July – December, 2008.
9. S. Chutipaijit, S. Cha-um and K. Sompornpailin. Alteration of Proline and Anthocyanin Levels Affects Salinity Tolerance in *Indica* Rice Seedling. KMITL Sci. J. Vol.8 No.2, 2008. 1-7
10. S. Chutipaijit, S. Cha-um and K. Sompornpailin. Influence of Drought Stress on Proline and Anthocyanin Accumulation in *Indica* Rice Cultivars. KMITL Sci. J. Vol.8 No.2, 2008. 78-85
11. S. Chutipaijit, S. Cha-um and K. Sompornpailin. Modulation of proline and anthocyanin levels improves salt tolerant in *indica* rice seedlings. J of Biotech, Volume 136, Supplement 1, 2008, S152
12. S. Chutipaijit, S. Cha-um and K. Sompornpailin. Differential Accumulation of Proline and Flavonoids in *Indica* Rice Varieties against Salinity. Pak. J. Bot., 2009. 41(5) 2497-2506
13. O. Ketchart, S. Pontheeraphat, B. Saekow, W. Sripumkhai and K. Sompornpailin. Titanium Dioxide Thin Films on PCR tube deposited by Electron Beam Evaporation Technique. Proceeding of the 27<sup>th</sup> MST Annual Conference, 20-22 January 2010 Samui, Thailand. 209
14. Chutipaijit, S. Cha-um and K. Sompornpailin. Proline Accumulation and Physiological responses of *Indica* rice Genotypes differing in Tolerance to salt and drought stresses. Philipp. Agric. Scientist. Vol 93 No 2, 165-169.

15. K. Sompornpailin and T. Kasemsuk. Conversion of Glycerol into Polyhydroxyalkanoates (PHAs) using Bacterial Metabolism. InnoBioPlast 2010. 9-11 September 2010 Bangkok Thailand
16. O. Ketchart, S. Porntheeraphat, J. Nukeaw and K. Sompornpailin. Al Nanoparticles Deposited on PCR Tube Enhance DNA Amplification at Suitable  $MgCl_2$  Concentration. Proceeding of the 8<sup>th</sup> International Symposium on Biocontrol and Biotechnology, October, 4-6 2010 Pattaya, Thailand. 95
17. P. Darachai, S. Chutipaijit, S. and K. Sompornpailin. Carbon Sources and Supporting Materials in Callus Induction Effects on the Regeneration of *Indica* Rice. Proceeding of the 8<sup>th</sup> International Symposium on Biocontrol and Biotechnology, October, 4-6 2010 Pattaya, Thailand. 123
18. K. Sompornpailin, S. Chutipaijit. Relative of the flavonoid contents to antioxidant activity in Thai rice seeds. J Srinakharinwirot U (Science and Technology) 2011 Vol 3, 95-101
19. K. Sompornpailin, S. Kanthang. High accumulation of flavonoid pigments in transgenic tobacco overexpressing P<sub>AP1</sub> gene. J Srinakharinwirot U (Science and Technology) 2011 Vol 3, 102-106
20. S. Chutipaijit, K. Sompornpailin. Polyamines in Plant response to various abiotic stresses. SWU Sci. J. 2011 Vol 27 No 1 215-229
21. S. Chutipaijit, S. Cha-um, K. Sompornpailin. High contents of proline and anthocyanin increase protective response to salinity in *Oryza sativa* L. spp. indica. Australian Journal of Crop Sciences 2011 5(10) 1191-1198
22. P. Darachai, S. Chutipaijit, S. and K. Sompornpailin. Effect of Carbon Source and Gelling Agents on Callus Induction and Regeneration Efficiency of Thai Rice (*Oryza sativa* L. cv. RD6) 1st International Symposium on Technology for Sustainability - ISTS2011, KMUTL, Thailand, AGT003, 20-22
23. Chutipaijit, S. Cha-um, K. Sompornpailin. Influence of salinity on growth and antioxidant enzyme activities in indica rice cultivars (*Oryza sativa* L.) 1st International Symposium on Technology for Sustainability - ISTS2011, KMUTL, Bangkok, Thailand, AGT004, 23-26
24. S. Chutipaijit, S. Cha-um, K. Sompornpailin. An evaluation of water deficit tolerance screening in pigmented indica rice genotype. Par. J. Bot., 2012 44(1): 65-72
25. S. Chutipaijit, K. Sompornpailin. The Biotechnology Application in the chemical Industry. King Mongkut's Agro-Industry J. 2012 3(1): 30-43