1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ไนโตรเจนเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในกระบวนการสร้างสารในสิ่งมีชีวิต เช่น การสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิก จากการศึกษาพบว่าไนโตรเจนจะเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตในระบบสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน การควบคุมดังกล่าวมีอิทธิพลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของพืช ดังเช่นการทดลองในต้นยาสูบ (tobacco) พบว่าการขาดไนโตรเจนทำให้อัตราส่วนระหว่างรากและยอดลดลง (Scheible *et al*., 1997) ธาตุไนโตรเจนที่พืชทั่วไปดึงดูดขึ้นมาใช้ประโยชน์นั้น จะต้องอยู่ในรูปของอนุมูล (ไอออน) ของสารประกอบ เช่น แอมโมเนียม (NH_4^+) และไนเตรต (NO_3^-) ในสภาวะที่พืชขาดไนโตรเจนจะทำให้ต้นแคระแกร็น โตช้า ใบเหลือง โดยเฉพาะใบล่างจะแห้ง ร่วงหล่นเร็ว การออกดอกออกผลจะช้า แต่เมื่อมีปริมาณมากเกินความจำเป็นทำให้พืชอวบน้ำมาก ต้นอ่อน ล้มง่าย เป็นต้น (http://www.kanchanapisek.or.th)

พืชใช้แหล่งไนโตรเจนจากสารประกอบไนเตรต (nitrate complex) ในดินเพื่อการเจริญเติบโต โดยผ่านกระบวนการดูดซึมทางราก หลังจากนั้นไนเตรตถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรต์ (nitrite) และแอมโมเนียม (ammonium) โดยกระบวนการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (nitrate reductase, NR) และไนไตรต์รีดักเทส (nitrite reductase, NiR) ตามลำดับ จากนั้นแอมโมเนียรวมตัวกับกรดอะมิโนกลูตามิค (glutamic acid) เพื่อเปลี่ยนเป็นกลูตามีน (glutamine) และกรดอะมิโนชนิดอื่น โดยวิถีของเอนไซม์ Glutamine Synthetase-Glutamine-2-Oxoglutarate Amidotransferase (GS-GOGAT) กรดอะมิโนที่ได้จากกระบวนการรีดิวซ์ไนเตรตมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการขนย้ายไนโตรเจนระหว่างเซลล์และส่วนต่างๆ ของพืช จากการทดลองพบว่าปริมาณผลิตผลของกรดอะมิโนจากกระบวนการนำไนเตรตไปใช้มากเกินพอส่งผลยับยั้งการดูดซึมไนเตรตและกระบวนการไนเตรตรีดักชั่น (nitrate reduction) โดยเฉพาะการยับยั้งเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ควบคุมวิถี (rate limiting step) ของปฏิกิริยาการนำไนเตรตไปใช้ (nitrate assimilation) (Aslam *et al*., 2001)

ปัจจัยอย่างหนึ่งที่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส คือความเค็มในรูปของ NaCl โดยจะยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ในใบอ่อนและใบแก่ของ sugar beets การยับยั้งจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้น แต่ใบอ่อนจะมีแอคติวิตีของเอนไซม์สูงกว่าใบแก่ และความเค็มจะรบกวนการทำงานของเนื้อเยื่อราก ทำให้ดูดซึมไนเตรตได้น้อยลง นอกจากนี้พบว่าการเพิ่มความ

เข้มข้นของเกลือทำให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของใบและรากลดลง (Ghoulam *et al*., 2002) ปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลงแต่ระดับโปรตีนจะเพิ่มขึ้น (Rai and Rai, 2003)

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส เป็นเอนไซม์ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ แบ่งโมเลกุลเป็น 3 ส่วน (domain) แต่ละส่วนมีโคแฟกเตอร์เป็นองค์ประกอบคือ FAD, heme และ molybdenum-pterin (Mo-pterin) ช่วยเร่งปฏิกิริยา มีการศึกษาเกี่ยวกับแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส โดยพบว่าแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส บริสุทธิ์จะมีความจำเพาะสูงกับทั้ง 3 domain ในสาหร่ายและพืชชั้นสูง แอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสสามารถเกิด cross-reactivity อย่างชัดเจน แอนติบอดีจะจดจำ Mo-pterin domain ซึ่งมีลำดับของกรดอะมิโนที่เหมือนกันมากที่สุดในโมเลกุลของไนเตรตรีดักเทสทั้งหมด (Lopes *et al*., 2002)

ในงานวิทยานิพนธ์นี้ ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาผลกระทบของความเค็มที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสและการดูดซึมไนเตรตไปใช้ในต้นข้าว 3 สายพันธุ์ ตลอดจนเตรียมแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาดูการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในต้นข้าวที่ได้รับเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้นต่างๆ และเตรียมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสให้บริสุทธิ์โดยวิธีทางชีวเคมี เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวที่ทนเค็มซึ่งจะเป็นประโยชน์กับเกษตรกรต่อไปในอนาคต

การตรวจเอกสาร

1.1 เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (Nitrate Reductase; NR)

1.1.1 ความสำคัญของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

การนำไนเตรตไปใช้ในสิ่งมีชีวิตต้องอาศัยเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในการเร่งปฏิกิริยา ซึ่งจะเกิดขึ้นดังปฏิกิริยาต่อไปนี้

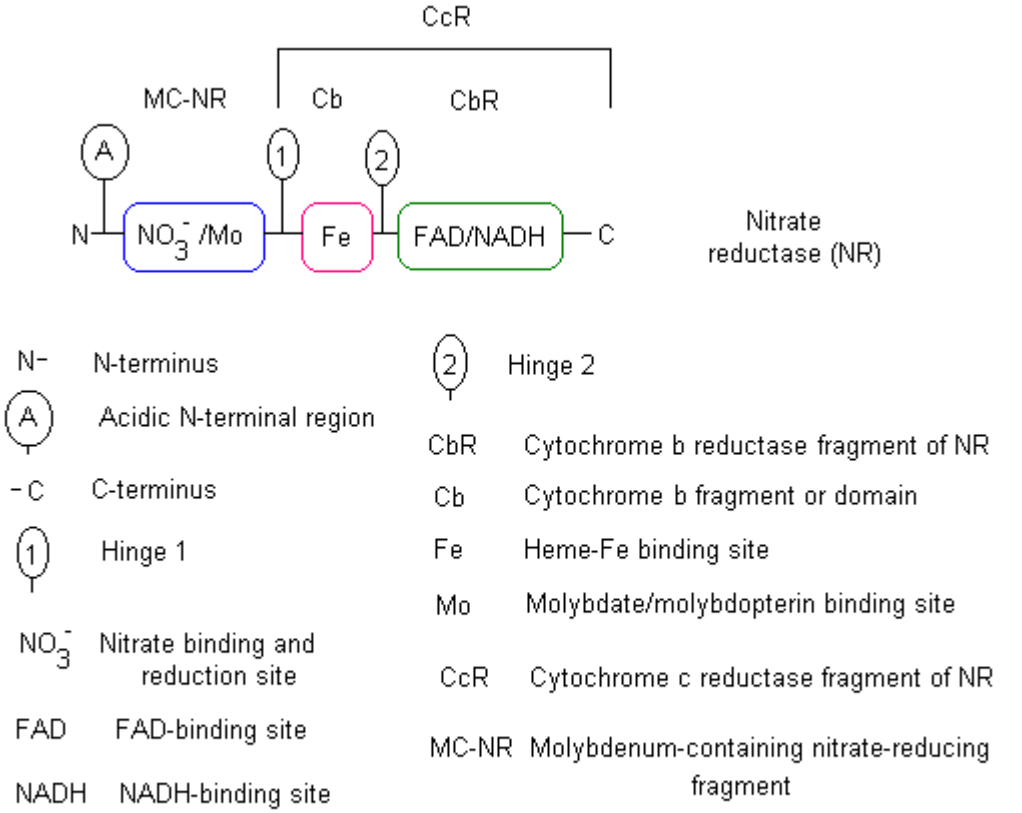
$$NO_3^- + NADH \xrightarrow{NR} NO_2^- + NAD^+ + OH^-$$

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสเป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีการนำไนเตรตไปใช้ (nitrate assimilation) และอาจเป็นตัวควบคุมความเร็วของปฏิกิริยา (rate-limiting step) ในพืชชั้นสูงพบเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในรากและใบ เอนไซม์จะถูกชักนำโดยไนเตรตถ้าปริมาณไนเตรตสูงทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสสูงไปด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งช่วงที่มีแสง (Campbell, 1999)

1.1.2 โครงสร้างของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

Campbell (1999) ได้รายงานว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสเป็นโฮโมไดเมอร์ (homodimer) ซึ่งประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย แต่ละหน่วยย่อยมีขนาดประมาณ 100 กิโลดาลตัน (kDa) โดยมี flavin adenine dinucleotide (FAD), heme-Fe และ molybdenum-molybdopterin (Mo-MPT) เป็นโคแฟคเตอร์ (co-factor) โมเลกุลของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ประกอบด้วย 8 ส่วน (รูปที่ 1) ดังนี้

1) N-terminal “acidic” region
2) Mo-MPT domain ที่มี nitrate-reducing active site
3) Interface domain
4) Hinge 1 จะมี serine ที่ถูก phosphorylated ในกระบวนการการควบคุมการทำงานแบบย้อนกลับซึ่งจะถูกยับยั้งโดย 14-3-3 binding protein
5) Cytochrome b domain (heme-Fe จับอยู่)
6) Hinge 2 จะมี proteinase site
7) FAD domain
8) NAD(P)H domain



From: Campbell WH 1996 Nitrate reductase biochemistry comes of age. Plant Physiol 111:355-361

รูปที่ 1 แบบแผนโครงสร้างของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต

Guerrero และคณะ (1981) จำแนกชนิดของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสตามความจำเพาะกับตัวให้อิเล็คตรอน ได้เป็น 2 ชนิด คือ

1) ferredoxin-dependent nitrate reductase พบในพวกไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) เช่น blue-green algae และรวมทั้งใน chemoergonic และ photosynthetic bacteria โดยเอนไซม์ในกลุ่ม photosynthetic bacteria สามารถจับกับเมมเบรนอย่างหนาแน่น

2) pyridine nucleotide-dependent nitrate reductase พบในสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต ซึ่งเป็น soluble enzyme

1.1.3 หน้าที่และการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสควบคุมการเปลี่ยนไนเตรตที่อยู่ในรูปสารอนินทรีย์ให้เป็นสารอินทรีย์ภายในพืช (Beever and Hageman, 1969) โดยควบคุมอย่างน้อย 2 ทาง คือ การสังเคราะห์และสลายโปรตีน (ระดับของ NR protein ผ่านการควบคุมในระดับยีน) การเปลี่ยนแปลงการทำงานโดยกระบวนการเติมหรือตัดหมู่ฟอสเฟตบนโมเลกุลของเอนไซม์ (protein phosphorylation หรือ protein dephosphorylation) จะตอบสนองต่อแสงหรือความมืด (Campbell, 1999) นอกจากนี้พบว่าการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในใบขึ้นอยู่กับปริมาณไนเตรตที่มาจากราก (Ferrario *et al*., 1998)

หากพิจารณารูปแบบการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากลักษณะการรับอิเล็กตรอนจาก NADH หรือ NADPH หรือ NAD(P)H โดยแบ่งเป็น 3 รูปแบบ (Campbell, 1999) คือ

1) NADH-specific NR เป็นรูปแบบทั่วไปพบในพืชชั้นสูง และ สาหร่าย
2) NAD(P)H-bispecific NR พบในพืชบางชนิด เช่น ข้าวโพด ข้าว และข้าวบาร์เลย์ นอกจากนี้ยังพบในสาหร่ายและรา
3) NADPH-specific NR พบในรา

1.1.4 การแพร่กระจายของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสิ่งมีชีวิต

มีการศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด (Campbell, 1999) โดยสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

1.1.4.1 ไนเตรตรีดักเทสในพวกโปรคาริโอต

NR ในโปรคาริโอต เช่น Cyanobacteria มีขนาดโมเลกุลประมาณ 750 กิโลดาลตัน มี molybdenum เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลแต่ไม่มี flavin adenine dinucleotide (FAD) หรือ heme โดยพบว่า NR จับอยู่ที่ thylakoids และใช้ FADH จากการสังเคราะห์แสงแต่ไม่ใช้ NAD(P)H เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

1.1.4.2 ไนเตรตรีดักเทสในพวกยูคาริโอต

NR ในยูคาริโอตมีขนาดโมเลกุลประมาณ 200-300 กิโลดาลตัน มี FAD, heme (Cytochrome b_{557}) และ molybdenum-pterin เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล โดยในสาหร่ายรวมทั้งเนื้อเยื่อของพืชชั้นสูงที่สังเคราะห์แสงจะพบ NR ในไซโทซอลหรือติดอยู่กับด้านนอกของคลอโรพลาสต์และได้รับอิเล็กตรอนจากการสังเคราะห์แสงหรือการสลายคาร์โบไฮเดรต

1.1.5 วิธีการศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสและกลไกการเกิด ปฏิกิริยา

การศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสมีหลายวิธี ได้แก่ การวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นหรือสารตั้งต้นที่ลดลง

1.1.5.1 การใช้ NAD(P)H เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

$NO_3^- + NAD(P)H \xrightarrow{NR} NO_2^- + OH^- + NAD^+$ มีหลักการดังนี้

ก. วัดปริมาณไนไตรต์ (NO_2^-) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส เทียบกับเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา โดยการทำให้ไนไตรต์เปลี่ยนเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีชมพูอมม่วง ซึ่งได้จากการทำปฏิกิริยากับ *N*-(1-napthyl)ethylenediamine dihydrochroride ในสภาวะที่เป็นกรด แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (Nakamura and Ikawa, 1993; Feil *et al*., 1993; Ramalho *et al*., 1995; Larios *et al*., 2001)

ข. วัดอัตราการลดลงของสารตั้งต้น ได้แก่ NAD(P)H โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของ NAD(P)H ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตรเทียบกับเวลา (Lillo *et al*., 1997)

1.1.5.2 การใช้ methyl viologen เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

หลักการ คือ reduced methyl viologen จะถูกออกซิไดส์โดย molybdenum domain ซึ่งเป็น domain ส่วนสุดท้ายของโมเลกุลของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส จากนั้นอิเล็กตรอนจะถูกส่งต่อไปใช้ในการรีดิวซ์ไนเตรตไปเป็นไนไตรต์ได้ การวัดปฏิกิริยาทำได้โดยการวัดปริมาณไนไตรต์ที่เกิดขึ้นจากการเกิดปฏิกิริยาเทียบกับเวลา (Coombs and Hall, 1982; Antipov *et al*., 2000)

1.1.6 การเตรียมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสให้บริสุทธิ์

การศึกษาของ Solomonson (1975) ที่ได้สกัดแยกเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสให้บริสุทธิ์จากสาหร่ายสีเขียว (*Chlorella vulgaris*) พบว่าการชะเอนไซม์ออกจากคอลัมน์ชนิด affinity-medium เช่น Blue Dextran Sepharose ซึ่งอาศัยการจับที่จำเพาะกับ NADH ของเอนไซม์จะใช้ NADH ในระดับความเข้มข้นเป็นไมโครโมลาร์ แต่ในพืชชั้นสูงพบว่า การจับที่จำเพาะระหว่างเอนไซม์กับตัวกลางดังกล่าวนั้นมีสูง จึงจำเป็นต้องใช้เกลือความเข้มข้นสูงช่วยชะเอนไซม์ (Campbell, 1996) ต่อมาได้มีการพัฒนา affinity-medium มาเป็น Blue Sepharose ซึ่งจับกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้สูงขึ้น และได้ใช้ในการทำเอนไซม์จากพืชชั้นสูงหลายๆ ชนิดให้บริสุทธิ์ขึ้น เช่น ถั่วเหลือง (Jolly *et al*., 1976; Campbell *et al*., 1987) ข้าวบาร์เล่ย์ (Campbell and Wray, 1983) และผักโขม (Jawali and Sane, 1984)

Kramer และคณะ (1987) รายงานว่า การทำเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในพืชชั้นสูงให้บริสุทธิ์ขึ้น จะพบว่ามีการสูญหายขององค์ประกอบพวก FAD และ molybdenum ระหว่างขั้นตอน

การสกัด, ทำบริสุทธิ์และปริมาณเอนไซม์ที่ได้จะต่ำ (น้อยกว่า 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักสดของพืชหนึ่งกิโลกรัม)

การแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในราและพืชบางชนิดทำได้ง่าย พืชที่สามารถแยกและศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ได้ดีที่สุดคือ ข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare* L.) และแตงน้ำเต้า (*Curcubita maxima* L.) โดยพบว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสเป็นโฮโมไดเมอร์ (homodimer) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 200-230 กิโลดาลตัน และหน่วยย่อยมีขนาด 100-115 กิโลดาลตัน (Vance and Griffith, 1990)

Martinez-Espinosa และคณะ (2001) ได้สกัดแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในแบคทีเรียกลุ่ม haloarchaeon (*Haloferax mediterranei*) โดยเตรียมสารสกัด, ผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟี 3 ขั้นตอน คือ Seharose-4B chromatography, DEAE-cellulose chromatography และ Sephacryl S-300 chromatography ตามลำดับ โดยพบว่าเอนไซม์ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย มีขนาดต่างกัน คือ 105 $\pm$ 1.3 กิโลดาลตัน และ 50 $\pm$ 1.3 กิโลดาลตัน มีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ pH 9.0 โดยเอนไซม์จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

Lopes และคณะ (2002) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในช่วงเวลาต่างๆ ของวันแต่ละวัน พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจะสูงสุดในช่วงเที่ยงวันและได้สกัดแยกเอนไซม์จากสาหร่ายสีแดง (*Gracilaria tenuistipitata*) ให้บริสุทธิ์ โดยการแยกผ่านคอลัมน์ Q-Sepharose, ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต, แยกผ่านเจลฟิวเตรชั่นแบบ Sephacryl S-300 และโครมาโทกราฟีแบบ Affigel-blue resin ทำให้ได้เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่บริสุทธิ์กว่าเดิมประมาณ 500 เท่าคิดเป็น 85%

เขมิกา โขมพัตร (2545) ได้ทำเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงให้บริสุทธิ์ โดยนำสารสกัดมาแยกโดยคอลัมน์ Blue–Sepharose ปรากฏว่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูญหายไปหลังจากการแยก และเมื่อนำส่วนที่ชะออกจากคอลัมน์ไปทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่เสียสภาพ พบโปรตีนไม่น้อยกว่า 5 ชนิด

1.1.7 แอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

แอนติบอดีสำหรับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (Anti-NR) ในพืชสามารถผลิตออกมาได้ 2 ชนิด คือ แอนติบอดีชนิดโพลีโคลนอล (rabbit polyclonal anti-NR) และ แอนติบอดีชนิดโมโนโคลนอล (monoclonal anti-NR) โดยใช้ NR จากแตงน้ำเต้า (squash: *Curcubita maxima*) และจากข้าวโพด (corn: *Zea mays*) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เป็นตัวกระตุ้น แอนติบอดีชนิดโพลีโคลนอล ส่วนใหญ่ใช้ประโยชน์ในการทำ Western blot และ ELISA ส่วนแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนอลสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสโดยวิธี immunoaffinity chromatographic (http://www.nitrate.com/ab2.htm)

Nakamura และคณะ (1994); Lopes และคณะ (2002) พบว่าแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนอล (monoclonal antibody) ต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่ทำให้บริสุทธิ์จากสาหร่าย *Porphyra yezoensis* จะมีความจำเพาะสูงกับโคแฟคเตอร์ทั้ง 3 ชนิด ในพวกสาหร่ายและพืชชั้นสูง เช่น *Porphyra* และ *Gracilaria* ซึ่งอยู่ในดิวิชั่น (division) เดียวกัน เป็นพวกสาหร่ายสีแดง (Rhodophyta) แอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสสามารถเกิด cross-reactivity อย่างชัดเจน แอนติบอดีจะจดจำ Mo-pterin domain ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกันมากที่สุดในโมเลกุลของไนเตรตรีดักเทส โดยแอนติบอดีจาก *Porphyra* จะยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของ *Gracilaria* และจากการทำ Western blots พบว่า antiserum จะทำปฏิกิริยากับสารสกัดหยาบ (crude extract) และเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ซึ่งมีแถบเดียวขนาดประมาณ 110 กิโลดาลตัน นอกจากนี้ระดับของ NR protein ที่สกัดได้จะเปลี่ยนแปลงไปในทางเดียวกับแอคติวิตีด้วย

จากการศึกษาของ Mattana และคณะ (1994) พบว่า แอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสและไนไตรต์รีดักเทสจากข้าวบาร์เลย์และข้าวโพด สามารถเกิด cross-reactivity กับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากข้าวได้

Jochem และคณะ (2000) ได้ศึกษาปริมาณของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในเซลล์ของ Marine Diatom (*Skeletonema costatum*) พบว่าปริมาณของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่มีในระดับต่ำจะทำให้มีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสต่ำมากด้วยแต่ยังสามารถวัดได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากในอาหารมีปริมาณของไนเตรตต่ำ นอกจากนี้พบว่า NR antiserum จาก NR protein ในรูปที่ทำงานไม่ได้ (inactive forms) ให้ผลไม่แตกต่างกันและแอคติวิตีของ NR protein จะเปลี่ยนแปลงตลอดช่วงการปรับตัวทางสรีรวิทยา สำหรับการพัฒนา antiserum ในการหาความแตกต่างของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในรูปที่ทำงานได้และทำงานไม่ได้ยังไม่ชัดเจน นอกจากนี้แอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของ *S. costatum* สามารถเกิด cross-reactivity กับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของ marine diatoms ชนิดอื่นได้

Weiner และคณะ (1999) ใช้เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสฉีดกระต่ายขาวตาแดง พบว่ากระต่ายสามารถสังเคราะห์แอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้ เมื่อนำมาทดสอบการมีแอนติบอดีปรากฏว่ามีตะกอนเกิดขึ้นแสดงว่าแอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่อโปรตีน 14-3-3 จากใบผักโขมที่สกัดได้จากใบที่อยู่ในที่มืด

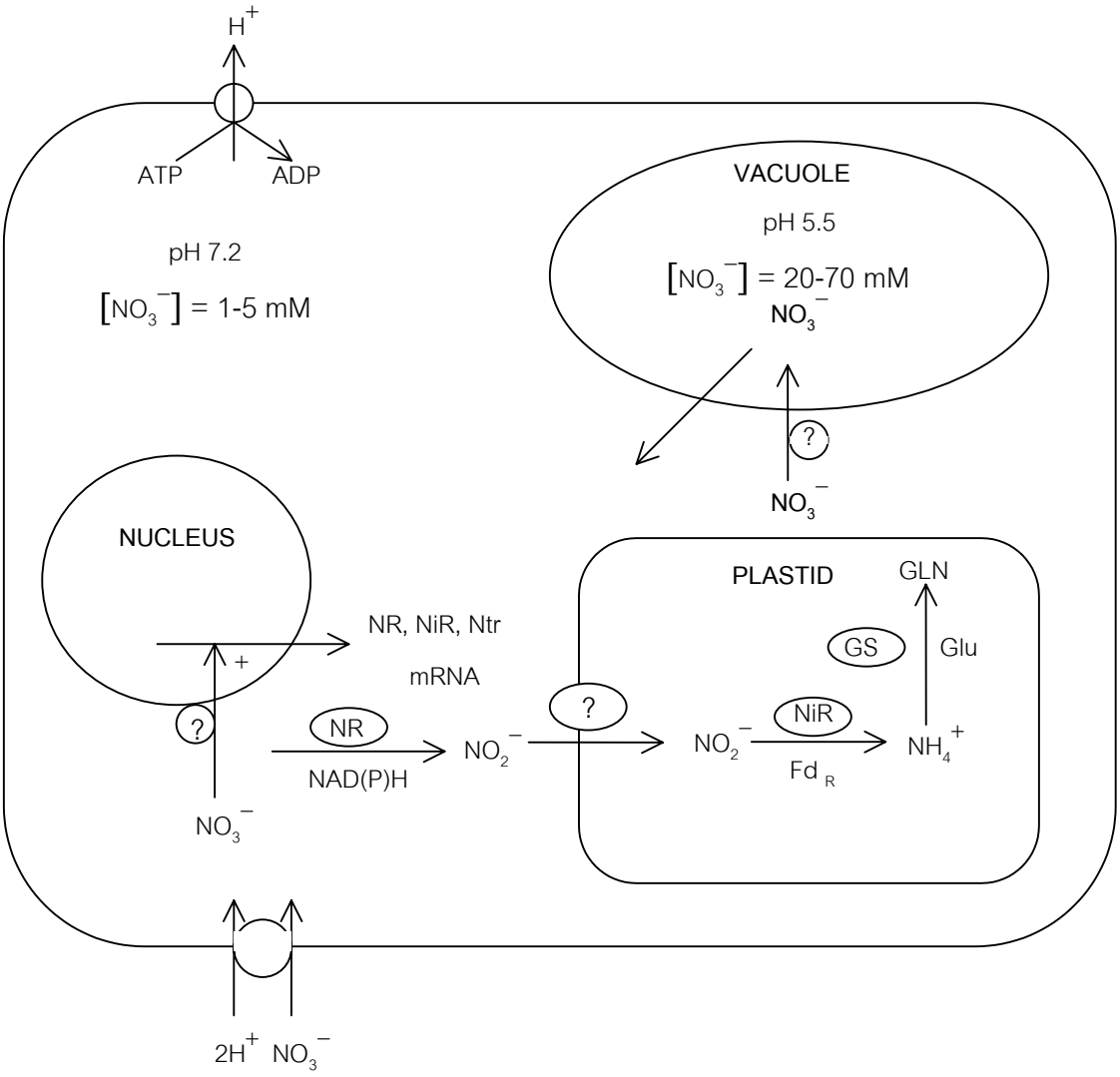
1.2 ไนเตรตรีดักเทสในพืช

1.2.1 การนำไนเตรตเข้าสู่พืช

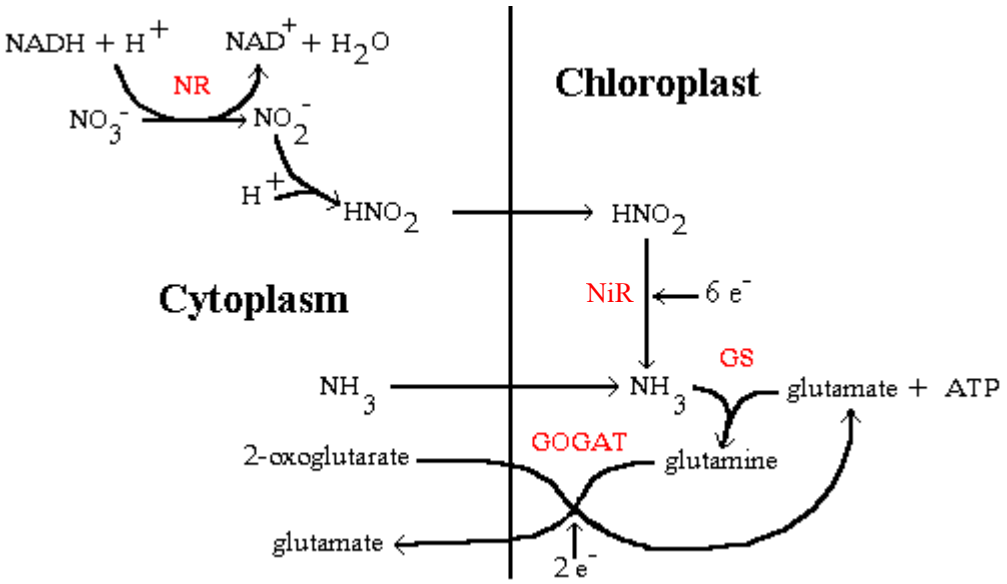
พืชจะเริ่มดูดซึมไนเตรตจากสารละลายในดินผ่านพลาสมาเมมเบรนของเซลล์ชั้นนอกสุด (epidermal cells) และชั้นคอร์เท็กซ์ (cortical cells) ของราก (Larsson and Ingemarsson, 1989) หลังจากนั้นจะขนส่งผ่านโทโนพลาสต์เมมเบรน (tonoplast membrane) (Granstedt and Huffaker, 1982; Blumwald and Poole, 1985; Miller and Smith, 1992) และพลาสมาเมมเบรนของเซลล์ในระบบท่อลำเลียง (vascular system) และใบ (Jackson *et al*., 1986)

ระบบการดูดซึมไนเตรตในพืชจะต้องมีการเปลี่ยนแปลงระบบรากหรือปรับสภาพเพื่อรองรับสภาวะต่างๆได้ เนื่องจากพืชต้องมีระบบการขนส่งไนเตรตที่มีประสิทธิภาพตามความต้องการไนเตรตภายในเซลล์เพื่อการเจริญเติบโต การนำไนเตรตเข้าสู่เซลล์ต้องใช้พลังงานที่จะขับเคลื่อนหรือผลักไนเตรตสู่เซลล์โดยใช้ proton gradient ซึ่งได้มาจากการทำงานของ H^+-ATPase ซึ่งอยู่ที่พลาสมาเมมเบรน (Crawford, 1995)

H^+-ATPase ที่พลาสมาเมมเบรนจะปั๊มโปรตอน (H^+) ออกจากเซลล์ ซึ่งจะทำให้เกิดความแตกต่างของ pH และ electrical gradients ภายนอกและภายในเซลล์ nitrate transporters (Ntr) จะช่วยขนส่งโปรตอน 2 ตัวหรือมากกว่านั้นต่อไนเตรต 1 ตัว เข้าสู่เซลล์ ไนเตรตถูกขนส่งผ่านโทโนพลาสต์และเก็บไว้ในแวคิวโอล (vacuole) ส่วนไนเตรตในไซโทซอลจะถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรต์ซึ่งจะผ่านพลาสติด (plastid) และถูกเปลี่ยนเป็นแอมโมเนีย (NH_3) แอมโมเนียจะจับกับกลูตาเมต (Glu) กลายเป็นกลูตามีน (GLN) โดยอาศัยเอนไซม์ glutamine synthetase (GS) นอกจากนี้ไนเตรตยังเป็นเหมือนสัญญาณที่เพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (NR), ไนไตรต์รีดักเทส (NiR) และยีน *Ntr* อีกด้วย (รูปที่ 2 และ 3)



รูปที่ 2 ไดอะแกรมแสดงกลไกการนำไนเตรตไปใช้ในเซลล์พืช (nitrate assimilation pathway) (Crawford, 1995)

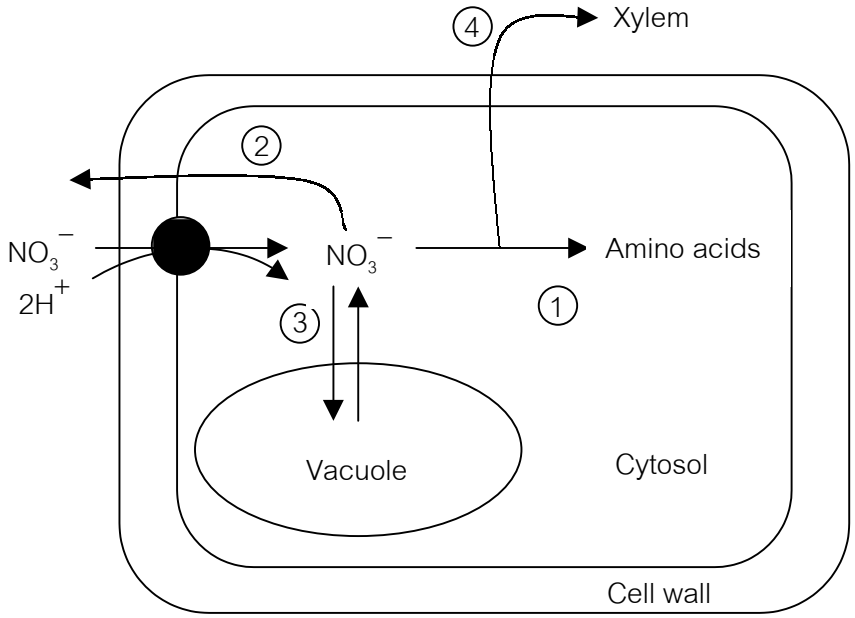


รูปที่ 3 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนไนเตรตเป็นไนไตรต์และแอมโมเนีย ซึ่งจะใช้ต่อในการสังเคราะห์กรดอะมิโนสำคัญคือ กลูตาเมต

1.2.2 ระบบการขนส่งไนเตรตและขั้นตอนการใช้ไนเตรตในพืช

จากการศึกษาของ Crawford and Glass (1998) พบว่าจากสารละลายในดินไนเตรตถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์รากและมีการขนส่ง 4 ทาง คือ 1) เปลี่ยนเป็นไนไตรต์โดยอาศัยเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่อยู่ในไซโทพลาสซึม 2) นำกลับออกข้างนอกเซลล์ผ่านพลาสมาเมมเบรนไปยัง apoplasm 3) นำเข้าไปในเซลล์และเก็บไว้ในแวคิวโอล หรือ 4) ขนส่งไปยังใบและยอดโดยผ่านทางไซเลม (xylem) ซึ่งเป็นการขนส่งในระยะยาว (long-distance translocation) (รูปที่ 4) สำหรับการขนส่งแบบสุดท้าย พบว่าไนเตรตจะออกจากไซเลมผ่าน leaf apoplasm เข้าสู่เซลล์ชั้นมีโซฟิลล์ (mesophyll cells) ของใบเพื่อดูดซึมไนเตรตอีกครั้ง และอาจเปลี่ยนเป็นไนไตรต์หรือเก็บไว้ใน

แวคิวโอล แม้กระบวนการขนส่งและดูดซึมไนเตรตในใบจะน้อย แต่ไนเตรตที่ความเข้มข้นสูงที่อยู่ในของเหลวภายในไซเลม (xylem sap) (5-40 mM) และที่ระดับต่ำในโฟลเอม (phloem) ถือว่ามีความสำคัญต่อการดูดซึมไนเตรตทั้งสิ้น



รูปที่ 4 เส้นทางการเข้า-ออกของไนเตรต (NO_3^-) ภายในเซลล์ (Crawford and Glass, 1998)

การขนส่งไนเตรตเข้าสู่เซลล์พืช จะต้องอาศัยตัวขนส่งไนเตรต (nitrate transporter) ซึ่งจะอยู่ที่เมมเบรน ตัวขนส่งไนเตรตดังกล่าวมียีน 2 กลุ่มควบคุม ได้แก่ 1) *RT*2 เป็น high-affinity carrier ประกอบด้วยกรดอะมิโน 503-507 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 54-55 กิโลดาลตันและ 2) *NRT*1 เป็น dual- or low-affinity transporter ประกอบด้วยกรดอะมิโน 590 ตัว

จากการศึกษาโดย Chrispeels และคณะ (1999), Forde (2000) และ Glass และคณะ (2001) พบว่าระบบการขนส่งไนเตรตในรากพืชประกอบด้วย 3 ระบบ คือ

ระบบที่ 1 inducible high-affinity transport system (iHATS)

ระบบนี้จะทำงานเมื่อได้รับการชักนำจากไนเตรต หรือไนไตรต์ภายนอก ลำต้น และถูกควบคุมโดยระดับไนเตรตในเนื้อเยื่อ หรือผลผลิตที่ได้จากกระบวนการใช้ไนเตรตในพืช ปริมาณไนเตรตที่เหมาะสมจะอยู่ระหว่าง 0.2-0.5 mM, K_m 10-100 μM

ระบบที่ 2 constituitive high-affinity transport system (cHATS)

เป็นระบบที่ทำงานได้เอง แม้ว่าไม่มีไนเตรตจากภายนอกมากระตุ้นและมีความจำเพาะต่อไนเตรตสูง นอกจากนี้ในพืชบางชนิดพบว่าแอคติวิตียังสามารถกระตุ้นให้เพิ่มขึ้นได้หลายเท่าเมื่อได้รับไนเตรต

ระบบที่ 3 low-affinity transport system (LATS)

เป็นระบบที่ทำงานได้เองแต่ต้องมีระดับไนเตรตภายนอกเข้มข้นมากกว่า 1 mM

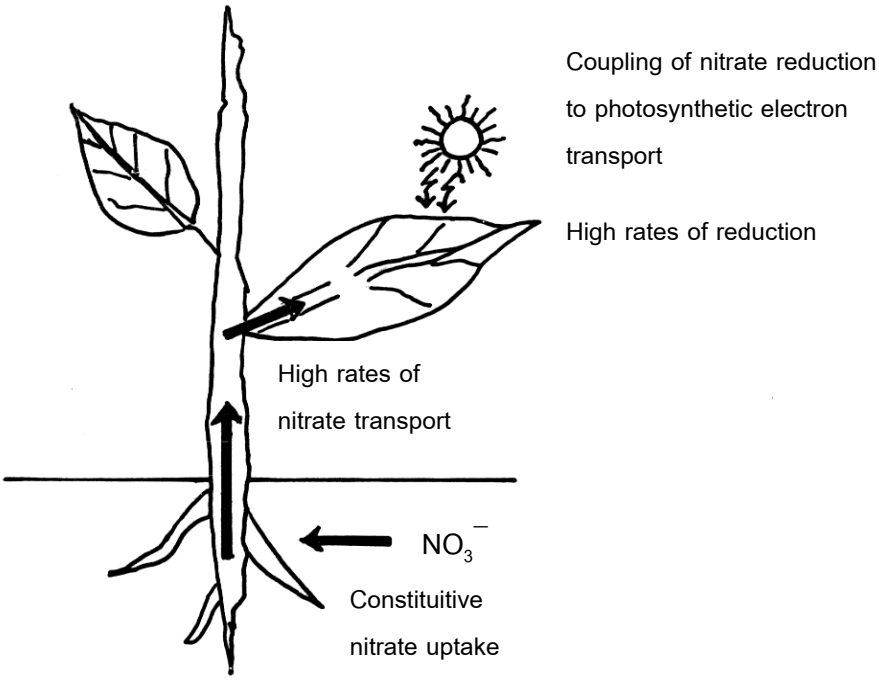
ในธรรมชาติพบว่าการนำไนเตรตเข้ามาใช้ในเซลล์พืชจะต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของระบบการขนส่งไนเตรตทั้ง 3 ระบบ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการดูดซึมและขนส่งไนเตรตในต้นพืช ซึ่งจะแตกต่างกันตามชนิดของพืชด้วย

1.2.3 กระบวนการสังเคราะห์แสงกับการใช้ไนเตรต

กระบวนการใช้ไนเตรตในเซลล์ของเนื้อเยื่อที่มีสีเขียว จะมีกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเข้ามาเกี่ยวข้อง โดยกระบวนการดังกล่าวนอกจากจะให้ reductant แล้วยังเพิ่มคาร์บอนเพื่อใช้ในการสังเคราะห์กรดอะมิโน ซึ่งสามารถดึงไนเตรตไปใช้ในการเปลี่ยนไปเป็นไนไตรต์และเปลี่ยนไปเป็นแอมโมเนียมต่อไป (รูปที่ 5)

ใน cyanobacteria สามารถแบ่งเอนไซม์ได้ 2 กลุ่มขึ้นอยู่กับ ferredoxin คือ 1) เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการนำไนเตรตไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงและ 2) เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายน้ำในกระบวนการสังเคราะห์แสง ส่วนสาหร่ายสีเขียว (green algae) และใบของพืชชั้นสูง พบว่าไนไตรต์รีดักเทสจะใช้ ferredoxin ในรูปรีดิวซ์ได้โดยตรงซึ่งมี NAD(P)H ไนไตรต์รีดักเทสเป็นตัวรับอิเล็คตรอนจาก ferredoxin ผ่าน pyrimidine nucleotide (ผลิต NADPH)

เนื้อเยื่อใบที่อยู่ในที่มืดและเนื้อเยื่อที่ไม่มีสีเขียว เช่น ราก พบว่าพลังงานส่วนใหญ่ที่ใช้ในการสลายไนเตรตและไนไตรต์ได้รับมาจากกระบวนการสลายคาร์โบไฮเดรตโดยใช้ออกซิเจน (carbohydrate oxidation)



รูปที่ 5 ไดอะแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกาดูดซึมไนเตรตไปใช้และการสังเคราะห์แสงของพืช (http://www.iisc.ernet.in/~currsci/may25/articles 26.htm)

1.2.4 กลไกการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในพืช

การควบคุมการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส แบ่งได้เป็น 2 ระดับ คือ ระดับ transcription และระดับ protein turnover (Hoff *et al*., 1995; Crawford, 1995) ต่อมา Douglas และคณะ (1995), Bachmann และคณะ (1996), Su และคณะ (1996) และ Lillo และคณะ (1997) แสดงให้เห็นว่า post-translation modification ของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสมีการเกิดกระบวนการ phosphorylation ซึ่งเป็นกระบวนการหลักในการควบคุมแอคติวิตีของเอนไซม์ สำหรับปฏิกิริยาการเกิด phosphorylation และ dephosphorylation ของเอนไซม์นี้มีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงโดย protein phosphatase ทำหน้าที่ในการตัดหมู่ฟอสเฟต ซึ่งโปรตีนนี้ถูกกระตุ้นโดยแสงในขั้นตอนการสังเคราะห์โปรตีน (Huber *et al*., 1992) นอกจากนี้ยังพบว่ามี inhibitor protein ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสภาวะที่มี divalent cations เช่น Ca^{2+}, Mg^{2+} และ Mn^{2+} ภายหลังจากเอนไซม์ถูกเติมฟอสเฟตที่ตำแหน่ง Ser-543 แล้ว ต่อมาพบว่า inhibitor protein ดังกล่าวคือ โปรตีน 14-3-3 (Bachmann *et al*., 1996; Moorhead

et al., 1996) จากการศึกษาของ Weiner และKaiser (1999) ในใบผักโขมพบว่า โปรตีน 14-3-3 มีบทบาทในการสลายเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส และได้ตรวจสอบการจับกันของโปรตีน 14-3-3 กับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดจากใบผักโขม พบว่าหมู่ฟอสเฟตของโปรตีน 14-3-3 จะจับกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (phospho-NR) บริเวณเซรีนตำแหน่งที่ 543 (Ser^{543}) และการจับกันของโปรตีนและเอนไซม์ดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของช่วงแสง (light/dark transition) ส่งผลให้เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสมีแอคติวิตีต่ำ (low activity) ทำให้ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรตไปเป็นไนไตรต์ได้ (MacKintosh *et al*., 1995)

1.3 การตอบสนองของพืชต่อความเค็ม

ดินเค็ม คือ สภาพดินที่มีปริมาณสาร NaCl หรือเกลือแกงอยู่ในปริมาณสูง สามารถวัดดินเค็มเป็นหน่วยของการนำไฟฟ้า โดยดินเค็มมักจะเห็นขุยเกลือตามผิวดิน มีวัชพืชจำพวกหนามแดง หนามปี หนามพรม และหญ้าขี้กลาก ปกคลุมอยู่ ความเค็มมักเปลี่ยนไปตามชั้นของดิน และฤดูกาล โดยในฤดูฝนเกลือจะถูกชะล้างไปสะสมอยู่ในชั้นล่างของดิน ฤดูแล้งเกลือจะระเหยขึ้นมากับน้ำสะสมอยู่ชั้นบน เนื้อดินส่วนใหญ่เป็นดินทราย ดังนั้นการขึ้นลงของเกลือตามชั้นของดินเป็นไปอย่างรวดเร็ว โดยถั่วเป็นพืชที่ทนเค็มได้ต่ำสุด มีค่าการนำไฟฟ้า 2-4 ds/m และข้าวเป็นพืชทนเค็มได้ปานกลาง มีค่าการนำไฟฟ้า 4-8 ds/m (พรรณี รุ่งแสงจันทร์, 2532; เล็ก มอญเจริญ, 2532; สมศรี อรุณินท์, 2532) ปัจจุบันความเค็มของดินเป็นปัญหาอย่างหนึ่งที่เกษตรกรมักประสบในการปลูกพืช

1.3.1 ความเค็มในดิน

ความเค็มในดิน มีผลต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาและชีวเคมีต่างๆ มากมาย รวมทั้งการนำไนเตรตไปใช้ โดยธาตุโซเดียมที่อยู่ในดินจะเกี่ยวข้องกับแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) และความเป็นพิษ (toxicity) ของเซลล์ ซึ่งจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตหรือผลผลิตของพืชหากมีการสะสมธาตุโซเดียมไว้ในปริมาณที่มากเกินพอ (เล็ก มอญเจริญ, 2532; Gouia *et al*., 1994) และความเป็นพิษที่เกิดจากความเค็มในข้าว เกิดจากการดูดซึมโซเดียมที่มากเกินความจำเป็นทำให้พืชดูดน้ำมาใช้ได้น้อยลง ส่งผลให้เกิดสภาวะ water stress ดังนั้นพืชจึงมีการปรับตัวต่อสภาวะที่มีเกลือโดยหลีกเลี่ยงการสูญเสียน้ำ (dehydration) เพื่อลด osmotic potential ภายในเซลล์พืช ทำให้อัตราการเจริญเติบโตก็ลดลงเช่นกัน การต่อต้าน (antagonistic effects) ต่อการดูดซึมธาตุอาหารอาจเกิดขึ้นได้ เนื่องมาจากการขาดแคลน K^+ และ Ca^{2+} ภายใต้สภาวะที่มีปริมาณโซเดียมมากเกินไป ตัวอย่างเช่น Na^+ จะต่อต้านหรือยับยั้งการดูดซึม K^+ (ในดินที่มีเกลือโซเดียมซึ่งทำให้พืชดูด K^+ ไปใช้ได้น้อยลง) ทำให้อัตราส่วนระหว่าง Na^+ กับ K^+ สูงในต้นข้าวและลดอัตรา

การขนส่ง K^+ ด้วย การยับยั้งจากการชักนำของโซเดียม (sodium-induced inhibition) ในการดูดซึมและเคลื่อนย้าย Ca^{2+} จะจำกัดการเจริญเติบโตของต้นอ่อน ความเค็มที่เพิ่มขึ้นจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส นั่นคือความเค็มจะขัดขวางการดูดซึมไนเตรต ทำให้พืชดูดซึมไนเตรตได้น้อยลง ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทสน้อยลงด้วย นอกจากนี้พบว่าการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในไซโทพลาสซึมจะต้องมีไนเตรตเป็นตัวป้องกันจากการทำงานของ proteases และตัวยับยั้งอื่นๆ ด้วย (Campbell, 1999) นอกจากนี้พบว่าความเค็มส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์และอัตราการสังเคราะห์แสงลดลงรวมทั้งเพิ่มอัตราการหายใจและปริมาณไนโตรเจนในต้นพืชได้ ปริมาณ K^+ และ Ca^{2+} ลดลงแต่ความเข้มข้นของ NO_3^-, Na^+, S^{2-} และ Cl^- ในเนื้อเยื่อของต้นอ่อน (shoot tissue) เพิ่มขึ้น ข้าวจะทนเกลือในช่วงเมล็ดที่กำลังงอก (germination) แต่มีความไวต่อเกลือสูงในช่วงแรกของการเจริญเติบโต (ช่วงที่มีใบ 1-2 ใบ) แล้วกลับมาทนอีกในช่วงแตกกอ (tillering) และการขยายตัวทางด้านลำต้นยืดยาว แต่จะกลับมาไวต่อเกลืออีกครั้งในช่วงออกดอก (flowering) นอกจากนี้ความเค็มยังลดอัตราการตรึงก๊าซไนโตรเจนและธาตุอาหารในดิน ทำให้ต้นข้าวแคระแกร็น ลดการแตกกอ เพิ่มช่อดอกที่เป็นหมันอีกด้วย (Dobermann and Fairhurst, 2000)

1.3.2 ความเครียดเนื่องจากความเค็ม

ความเค็มสูงเป็นสาเหตุที่กระตุ้นให้เกิดการสะสมพวกไอออนภายในเซลล์มากเกินไป (hyperionic) และมีการผ่านเข้าออกของไอออนมากเกินไป (hyperosmotic) ซึ่งสามารถทำให้เกิดการตายของพืชได้ (Glenn *et al*., 1999) ความเครียดดังกล่าวเกิดจากมีความเข้มข้นของโซเดียมไอออน (Na^+) และคลอไรด์ไอออน (Cl^-) ในสารละลายดินสูง สภาวะของน้ำเปลี่ยนแปลงทำให้การเจริญเติบโตเริ่มลดลง นอกจากนี้การเกิดกระบวนการดังกล่าวยังไปยับยั้งการแบ่งเซลล์ (cell division), การขยายขนาดของเซลล์ (cell expansion) และการเพิ่มอัตราการตายของเซลล์ (acceleration of cell death) (Munns, 1993; Yeo, 1998) ทำให้เมมเบรนเสียสภาพ (membrane disorganization), เกิด reactive oxygen species, เป็นพิษต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolic toxicity), ยับยั้งการสังเคราะห์แสง และได้รับสารอาหารน้อยลง ปัจจัยเหล่านี้ส่งผลให้เกิดความเสียหายของเซลล์ (Flowers *et al*., 1977; Greenway and Munns, 1980)

การศึกษาของ Gouia และคณะ (1994) พบว่า เกลือ NaCl มีผลต่ออัตราการเคลื่อนย้ายแคตไอออน (cation), ไนเตรต (NO_3^-) และสารประกอบพวกไนโตรเจน (N compounds) ที่ลำเลียงรากไปยังลำต้น ทำให้มีผลต่ออัตราการดูดซึมไนเตรต และเมื่อทดลองในพืช 2 ชนิดที่มีความไวต่อความเค็มแตกต่างกัน ได้แก่ ถั่ว (*Phaseolus vulgaris* L. cv Gabriella) และฝ้าย

(*Gossypium hirsutum* L. cv Akala) พบว่าหลังจากต้นพืชได้รับเกลือที่ความเข้มข้น 50 mM และ 100 mM เป็นเวลา 20 วัน มวลชีวภาพของพืชทั้ง 2 ชนิดลดลง โดยมวลชีวภาพของถั่วจะมากกว่าฝ้าย จากการเปรียบเทียบรูปแบบการเคลื่อนย้ายสาร (flow patterns) ในพืชกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับเกลือ แสดงให้เห็นว่าความเค็มมีผลไปลดการเข้าออกของไนเตรต รวมถึงการกระจายของสารประกอบไนโตรเจนและไอออนอื่นภายในต้น นอกจากนี้พบว่าความเค็มมีผลต่อความว่องไวของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในใบของพืชทั้ง 2 ชนิด ทั้งนี้เนื่องมาจากการแบ่งแยกส่วนของไอออน (compartmentalization of ion) ภายในเซลล์พืชที่ลดลงมากกว่าที่จะเกิดจากความแตกต่างในการทนทานต่อเกลือของตัวเอนไซม์เอง

1.3.3 การเคลื่อนที่ของเกลือผ่านต้นพืช

การเคลื่อนที่ของเกลือเข้าสู่รากและส่งไปยังลำต้นเกี่ยวข้องกับอัตราการระเหยของน้ำในต้นพืช (transpiration flux) หากไม่มีการควบคุมการระเหยจะทำให้ระดับการสะสมไอออนเป็นอันตรายต่อพืชได้ ทำให้พืชมีการตอบสนองอย่างทันทีทันใดกับปริมาณเกลือที่เพิ่มขึ้นโดยการปิดปากใบ (stomatal closure) เพื่อทำให้ไอออนที่เข้าสู่ต้นลดน้อยลง แต่การป้องกันดังกล่าวไม่สามารถป้องกันได่ในระยะยาวเนื่องจากมีความแตกต่างของแรงดันน้ำ (water potential) ระหว่างบรรยากาศกับเซลล์ใบ รวมถึงพืชยังต้องการใช้น้ำสำหรับกระบวนการตรึงคาร์บอน (Munns and Termaat, 1986) ดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกันส่วนที่เจริญเติบโตและกระบวนการเมแทบอลิซึมที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ พืชจึงมีการควบคุมการเคลื่อนที่ของไอออนภายในเนื้อเยื่อด้วยการควบคุมการไหลของเกลือเข้าสู่ต้นโดยผ่านทางไซเลม (xylem) โดยขนส่งผ่านเซลล์ส่วนที่มีชีวิต (symplastic ion transport) ในชั้นอิพิเดอร์มิสและชั้นคอร์ติคอล (epidermal and cortical cells) ซึ่งจะช่วยส่ง Na^+ เข้าสู่ไซเลม อย่างไรก็ตามในเซลล์ชั้นเอนโดเดอร์มิส (endodermis) ก็มีการเคลื่อนที่ของสารละลายผ่านวิถี symplastic เช่นเดียวกัน ขณะที่ casparian strip ในพืชจะช่วยขนส่งสารที่อยู่นอกเซลล์โดยผ่านระบบ apoplastic transport (Flowers and Yeo, 1992)

1.3.4 ความเค็มกับการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

ความเค็มมีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส โดยจากการศึกษาของ Ghoulam และคณะ (2002) พบว่าความเค็มส่งผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ในใบอ่อนและใบแก่ของ sugar beets หลายชนิด ซึ่งการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้น แต่ในใบอ่อนจะมีแอคติวิตีของเอนไซม์สูงกว่าใบแก่ นอกจากนี้พบว่าความเค็มมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ในต้น cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) เช่นเดียวกัน เนื่องจากเกลือไปรบกวนการทำงานของเนื้อเยื่อบริเวณราก ทำให้ลดการดูดซึมไนเตรตเข้าสู่ไซเลม (xylem) และมีผลทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสน้อยลงด้วย (Silveira *et al*., 2001)

1.3.5 การปรับตัวของพืชต่อความเค็ม

พืชทนเค็มคือ พืชที่สามารถอยู่รอดและเจริญเติบโตได้ในที่เค็มโดยให้ผลผลิตได้อย่างครบวงจร พืชต่างชนิดกันก็มีความสามารถในการทนเค็มแตกต่างกัน แม้แต่พืชชนิดเดียวกันแต่ต่างพันธุ์กัน ความทนต่อความเค็มก็ไม่เท่ากัน พืชบางชนิดมีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ในการทนเค็มได้แคบ เช่น ถั่วเขียว (สมศรี อรุณินท์, 2532) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับกลไกบางอย่างของพืชเพื่อบรรเทาความเป็นพิษของเกลืออาจแบ่งได้เป็น 3 ลักษณะ คือ 1) การไม่ดูดเกลือเข้าไป 2) การดูดเกลือเข้าไปแล้วสะสมเอาไว้เฉพาะที่ หรือ 3) การคายเกลือออกมา พืชที่จัดอยู่ในประเภทแรกจะพยายามปรับตัวเองโดยการปรับระบบโครงสร้างของรากให้แผ่กระจายไปยังจุดที่เค็มน้อยกว่าหรือปรับตัวเองให้ออกดอกช้าหรือเร็วกว่าปกติเมื่อมีความเค็มลดลงเพื่อหนีช่วงที่เค็มจัด หรือมีการฟื้นตัวอย่างรวดเร็วเมื่อความเค็มลดลง สำหรับพืชทนเค็มประเภทที่สอง อาจนำเกลือไปสะสมอยู่ในส่วนที่ไม่เป็นอันตรายต่อพืช เช่น สะสมในแวคิวโอล, เพิ่มความหนาของใบโดยการเพิ่มปริมาณน้ำในเซลล์ทำให้ความเข้มข้นของเกลือลดลง, เพิ่มความเครียดของปากใบ เพื่อให้คายน้ำน้อยลง นอกจากนี้มีการเลือกดูดธาตุโปแทสเซียมเข้าไปมากขึ้นหรือดูดธาตุโซเดียมน้อยลง, มีการขนย้ายธาตุโซเดียมจากใบอ่อนไปใบแก่ และสามารถสะสมธาตุโซเดียมไว้ตามลำต้นและราก เป็นต้น ส่วนพืชประเภทที่ 3 มีการสร้างต่อมเกลือ (leaf salt gland) เพื่อคายเกลือออกมา หรือมี leaf salt hair สำหรับขนส่งสารรวมทั้งเกลือเข้าไปเก็บใน bladder cell ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นกลไกของพืชในการปรับตัวเองเพื่อความอยู่รอดให้เข้ากับสภาพความเค็ม โดยพืชชนิดหนึ่งๆ อาจมีการปรับตัวลักษณะเดียวหรือหลายลักษณะรวมกันก็ได้ (สมศรี อรุณินท์, 2532; Hasegawa *et al*., 2000)

1.3.6 ความเค็มกับการเจริญเติบโตของข้าว

ปัจจุบันพบว่าปัญหาความเค็มมีผลต่อผลผลิตทางการเกษตรมากขึ้น โดยเฉพาะข้าว (*Oryza sativa* L.) จากการศึกษาของ Zeng และคณะ (2003) โดยได้ปลูกต้นข้าวในเรือนกระจกและเลี้ยงในสารละลายธาตุอาหารที่มี NaCl และ $CaCl_2$ พบว่าความเค็มและความลึกของน้ำมีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าและปริมาณสุทธิของเมล็ดข้าว นอกจากนี้ยังพบว่า ความเค็มยังมีผลต่อจำนวนช่อดอก (spikelet number) และจำนวนกอ (tiller number) อีกด้วย เมื่อมีความเครียดเนื่องจากความเค็มและระดับความลึกของน้ำที่เพิ่มขึ้น ทำให้ปริมาณสุทธิของเมล็ดลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการลดลงของจำนวนกอที่ไม่เป็นหมัน (fertile tiller number)

Grattan และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับความไวของข้าวต่อความเค็ม โดยได้ทดลองทั้งภาคสนามและควบคุมในสภาวะเรือนกระจก พบว่าข้าวมีความไวต่อความเค็มโดยลดการเจริญเติบโตของต้นมากกว่าราก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเจริญเติบโตของข้าวในระยะที่เริ่มงอก (emergence growth stage) และระยะแรกของต้นกล้า (early seedling growth stage)

การเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับเกลือ นอกจากนี้ยังพบว่าความเค็มมีผลในการเพิ่มช่อดอกที่เป็นหมัน (sterile florets) และลดปริมาณผลผลิตเมล็ด (grain yields) รวมทั้งลดขนาดของเมล็ด

1.4 ข้าว

ข้าวจัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวในตระกูลหญ้า โดยเป็นพืชล้มลุกที่มีใบยาวและบาง สามารถจำแนกกลุ่มของข้าวได้ดังนี้ (Lu, 1999)

Kingdom Plantae

Division Magnoliophyta

Class Liliopsida

Order Poales

Family Poaceae (Gramineae)

Subfamily Oryzoideae

Tribe Oryzae

Genus *Oryza*

Specie *Oryza sativa*

สัณฐานวิทยาของข้าว (แสดงดังรูปที่ 6) จำแนกออกเป็นช่วงการเจริญเติบโตทางด้านลำต้น (vegetative phases) ประกอบด้วยระยะเมล็ดงอก (germination stage) ระยะต้นกล้า (seedling stage) และระยะแตกกอ (tillering stage) อีกช่วงคือช่วงสืบพันธุ์ ซึ่งประกอบด้วยระยะ panicle initiation stage และ heading stage

ทวี คุปต์กาญจนากุล (2541) ได้รายงานเกี่ยวกับข้าว พบว่าข้าวประกอบด้วยส่วนสำคัญ คือ ส่วนต้นที่อยู่เหนือผิวดิน และรากซึ่งอยู่ใต้ผิวดิน

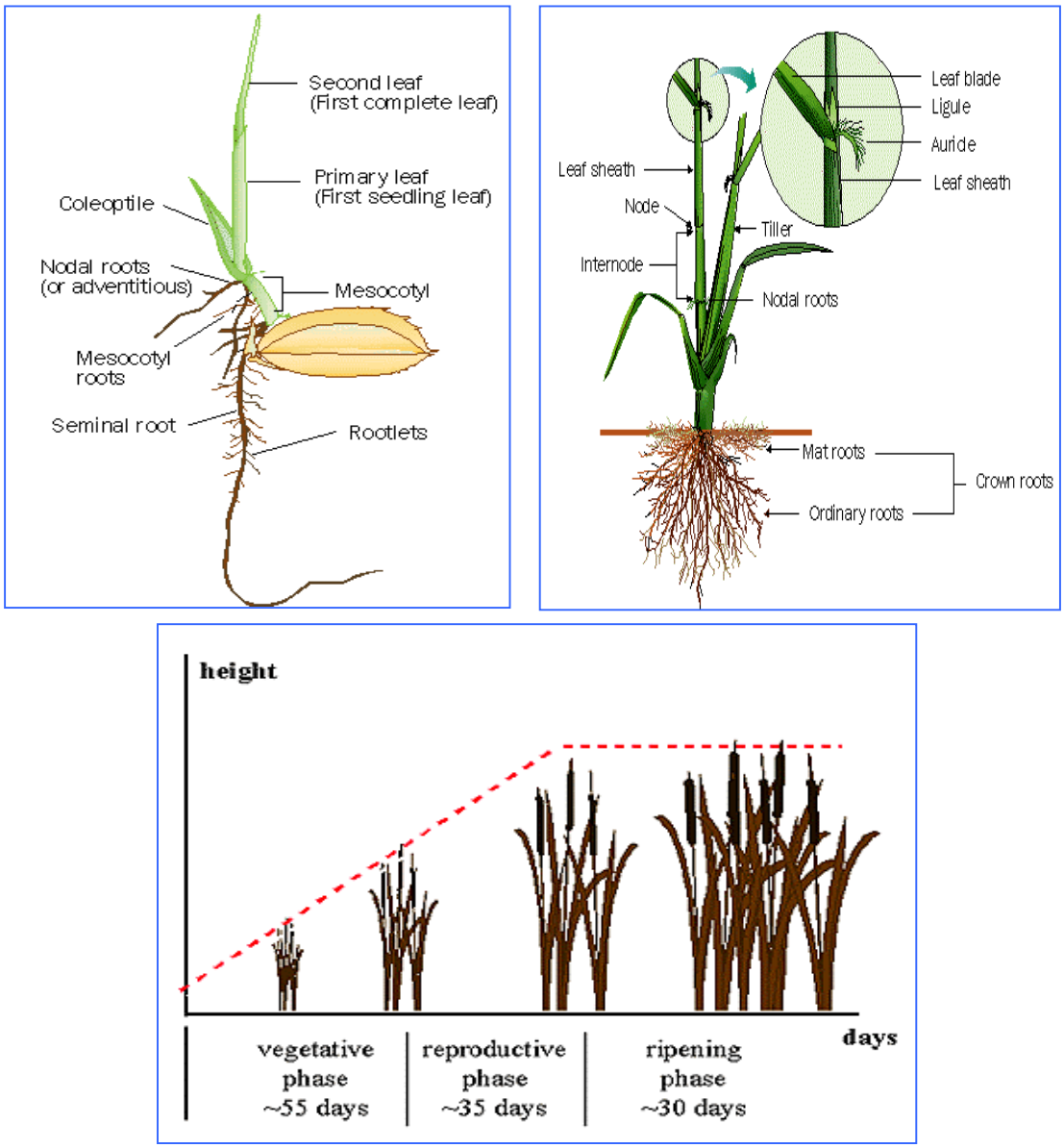
ส่วนของลำต้น ประกอบด้วย ลำต้น ใบ และ รวงข้าว

ลำต้น มีลักษณะทรงกลม ประกอบด้วย ปล้องหลาย ๆ ปล้องต่อเชื่อมกัน ภายในปล้องมีลักษณะกลวง เมื่อต้นข้าวยังมีอายุน้อย ต้นข้าวอยู่ในระยะต้นกล้า ปล้องเหล่านี้ยังไม่ยืดตัว แต่จะเชื่อมติดกัน ทำให้ไม่สามารถเห็นเป็นปล้องได้ชัดเจน

ใบข้าว ประกอบด้วย 2 ส่วนสำคัญ คือ ส่วนที่อยู่ติดกับข้อเรียกว่า กาบใบ มีลักษณะโค้งหุ้มลำต้นข้าว และส่วนยอดเรียกว่า แผ่นใบ มีลักษณะแบน สีเขียว ใบข้าวทำหน้าที่สำคัญในการสร้างสารอาหาร ซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต พัฒนาการและสร้างเมล็ด

รวงข้าว เกิดที่ปล้องสุดท้ายของลำต้น ประกอบด้วย ก้านรวง ระแง้ และเมล็ด

รากข้าว เป็นส่วนของต้นข้าวที่อยู่ในดิน ทำหน้าที่ยึดลำต้น ดูดน้ำและธาตุอาหารจากน้ำและดิน รากข้าวเป็นระบบรากฝอย เมื่อเกิดใหม่จะมีสีขาว แล้วค่อยเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อมีอายุมากขึ้น และเป็นสีดำเมื่อรากข้าวตาย



รูปที่ 6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญเติบโตของต้นข้าว
(http://www.IRRI/The Plant and How it Grows.htm)

ข้าวที่ปลูกโดยทั่วไปแบ่งตามสภาพการปลูกได้เป็น 2 พวก คือ ข้าวที่ปลูกในนาข้าวทั่วไป และข้าวที่ปลูกบนที่ดอนหรือในไร่ เรียกว่า ข้าวไร่

ข้าวไร่ เป็นข้าวที่ปลูกในที่ดอนบริเวณไหล่เขา หรือที่นาที่ไม่มีน้ำขัง ปลูกขึ้นง่ายโดยไม่ต้องมีน้ำหล่อเลี้ยงลำต้นและอาจตายได้หากปลูกในบริเวณที่มีน้ำขัง ต้องการความชุ่มชื้นของดินเช่นเดียวกับพืชไร่ สามารถปลูกเป็นพืชหมุนเวียนสลับกับพืชชนิดอื่นได้ และมีโปรตีนสูงกว่าข้าวนาดำ (ชัยฤกษ์ มณีพงษ์, 2524) ข้าวไร่จึงปลูกกันแพร่หลายในหมู่เกษตรกรชาวไร่และชาวเขาในภาคต่างๆ สำหรับในภาคใต้นิยมปลูกข้าวไร่ในที่ดอนทั่วไป และปลูกแซมในสวนยาง (ธีระ เอกสมทรา เมษฐ์, 2528) พันธุ์พื้นเมืองที่นิยมปลูกได้แก่ ข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวง และพันธุ์ดอกพยอม ลักษณะเด่นของข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ทนแล้ง และเมล็ดพันธุ์มีคุณภาพ (http://www.doa.go.th/data.agri/RICE.html) แต่ผลผลิตที่ได้ค่อนข้างต่ำเนื่องจากมีข้อจำกัดในการตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ย พันธุ์ข้าวที่นิยมปลูกเป็นข้าวไร่ในภาคใต้ ได้แก่ พันธุ์กู้เมืองหลวง ดอกพยอมและขาวดอกมะลิ 105 เป็นต้น

พันธุ์กู้เมืองหลวง เป็นพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่ใช้ปลูกเป็นข้าวไร่ในบางท้องที่ของภาคใต้เป็นเวลานานแล้วและได้ปลูกเก็บรักษาพันธุ์ไว้ที่สถานีทดลองข้าวควนกุฎ จ.พัทลุง ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ทนแล้งและปรับตัวเข้ากับสภาพไร่ได้ดีจึงเหมาะสำหรับปลูกเป็นข้าวไร่ นิยมปลูกเป็นพืชแซมยาง ต้านทานโรคไหม้ โรคใบจุดสีน้ำตาล โรคใบขีดสีน้ำตาล และต้านทานเพลี้ยจักจั่นสีเขียวปานกลางได้ดี ลักษณะลำต้นของข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงมีความสูงประมาณ 155 เซนติเมตร แตกกอได้ดี ในสภาพดินอุดมสมบูรณ์ต้นจะสูงมาก ลำต้นสีเขียวเข้ม ใบกว้าง การชูรวงดี คอรวงยาวจึงเหมาะสำหรับเกี่ยวด้วยแกระ ไวต่อช่วงแสง มักปลูกในต้นเดือนมิถุนายนและเก็บเกี่ยวกลางเดือนพฤศจิกายน หากปลูกปลายเดือนสิงหาคมจะเก็บเกี่ยวกลางเดือนมกราคม (อายุประมาณ 135-165 วัน) ผลผลิตเก็บเกี่ยวจากแปลงทดลองเฉลี่ยประมาณ 240 กก./ไร่ ระยะพักตัวของเมล็ดประมาณ 7 สัปดาห์ ข้าวเปลือกสีฟาง กระสีน้ำตาล น้ำหนัก 2.60 กรัมต่อ 100 เมล็ด เมล็ดข้าวกล้องยาว 8.41 มิลลิเมตร รูปร่างยาวเรียว ลักษณะข้าวสุก ร่วนแข็ง แต่มีข้อจำกัดคือเป็นพันธุ์ที่ออกดอกเร็ว ไม่เหมาะกับบางท้องถิ่น ไม่ต้านทานโรคขอบใบแห้ง และโรคใบวงสีน้ำตาล

ดอกพยอม เป็นพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่ปลูกเป็นข้าวไร่ในหลายท้องที่ทางภาคใต้ เช่น พังงา นครศรีธรรมราช กระบี่ และภูเก็ต เจ้าหน้าที่กองทุนสงเคราะห์การทำสวนยางได้รวบรวมพันธุ์และนำมาปลูกในปี พ.ศ. 2520 และเปรียบเทียบพันธุ์กับสถานีทดลองข้าวภาคใต้ พบว่าปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ทนแล้ง เหมาะสำหรับปลูกเป็นพืชแซมยางเพื่อเสริมรายได้ เมล็ดมีคุณภาพดี รสชาติอร่อย เกษตรกรนิยมปลูกกันมาก ข้าวดอก พยอมเป็นข้าวจ้าวที่ส่งเสริมให้ปลูกแบบข้าวไร่

ในภาคใต้ ลำต้นที่เจริญเติบโตเต็มที่สูงประมาณ 150 เซนติเมตร สีเขียวใบยาว ค่อนข้างแคบ ชูรวงดี เป็นข้าวไวต่อช่วงแสงอย่างอ่อน (อายุประมาณ 145-150 วัน) ปลูกต้นเดือนมิถุนายนเก็บเกี่ยวปลายเดือนตุลาคม หากปลูกปลายเดือนสิงหาคมจะเก็บเกี่ยวปลายเดือนมกราคม ผลผลิตจากแปลงทดลองเฉลี่ยประมาณ 250 กก./ไร่ ระยะพักตัวของเมล็ดประมาณ 2 สัปดาห์ ข้าวเปลือกสีฟาง ก้นจุด น้ำหนัก 2.58 กรัมต่อ 100 เมล็ด เมล็ดข้าวกล้องยาว 7.3 มิลลิเมตร รูปร่างยาวเรียว ลักษณะข้าวสุกนุ่ม และมีกลิ่นหอม มีลักษณะเด่นคือ คอยาว เหมาะสำหรับเกี่ยวด้วยแกระ ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมต่างได้ดี ปลูกเป็นพืชแซมยางได้ คุณภาพหุงต้มดี รสชาติอร่อย ต้านทานโรคไหม้ โรคใบจุดสีน้ำตาลและใบขีดสีน้ำตาล แต่ไม่ต้านทานโรคขอบใบแห้ง และโรคใบวงสีน้ำตาล

ขาวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์ข้าวหอมที่มีแหล่งกำเนิดอยู่ที่อำเภอพนัสนิคม จังหวัดลพบุรี ต่อมามีผู้นำมาปลูกที่ตำบลท่าทองหลาง อำเภอบางคล้า จังหวัดฉะเชิงเทรา โดยนำข้าวจำนวน 199 รวงมาปลูกเพื่อศึกษาพันธุ์ พบว่าข้าวรวงที่ 105 เป็นข้าวพันธุ์ดี จึงให้ชื่อว่า “ข้าวขาวดอกมะลิ 105” เหมาะสำหรับนาปีในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคกลางบางพื้นที่ ปลูกได้ในที่นาดอนทั่วไป ลำต้นที่เจริญเติบโตเต็มที่สูงประมาณ 140 เซนติเมตร เก็บเกี่ยวประมาณเดือนพฤศจิกายน ผลผลิตโดยประมาณ 365 กก./ไร่ ระยะพักตัวของเมล็ดประมาณ 8 สัปดาห์ ทนแล้ง ทนดินเปรี้ยวและเค็ม คุณภาพการหุงต้มดี มีกลิ่นหอม รสชาติดี ต้านทานไส้เดือนฝอยรากปม ไม่ต้านทานโรคไหม้ โรคขอบใบแห้ง โรคจู๋ เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยจักจั่นสีเขียว หนอนกอ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของความเค็มต่อการทำงาน (แอคติวิตี) ของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในต้นข้าว 3 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์กู้เมืองหลวง พันธุ์ดอกพยอม และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105
2. เพื่อเปรียบเทียบการตอบสนองของข้าวแต่ละสายพันธุ์ต่อความเค็มที่เพิ่มขึ้น
3. สังเคราะห์แอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์ในกระต่ายเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาดูการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในต้นข้าวที่ได้รับเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ
4. เพื่อแยกและทำเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากต้นข้าวให้บริสุทธิ์