ผลของความเค็มต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในต้นข้าว

Effect of Salinity on Nitrate Reductase Activity in Rice Plants (*Oryza sativa* L.)

ประทุม ฤทธิสุนทร

Pratum Ritthisunthorn

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biochemistry

Prince of Songkla University

2547

เลขหมู่ QK898.N54 ป16 2547 ฉ.1

Bib Key 247670

1800

ชื่อวิทยานิพนธ์	**ผลของความเค็มต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในต้นข้าว**
ผู้เขียน	นางสาวประทุม ฤทธิสุนทร
สาขาวิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2546

บทคัดย่อ

N_2 ในรูป NO_3^- เป็นธาตุอาหารหลักที่พืชดูดจากดินมาใช้สำหรับการเจริญเติบโตของพืช การใช้ไนเตรตจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความต้องการของพืช ปฏิกิริยาการเปลี่ยนไนเตรตไปเป็นไนไตรต์ถูกเร่งโดยกระบวนการที่พืชนำไนเตรตไปใช้ซึ่งถูกควบคุมด้วยเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ความเค็มเป็นปัญหาหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อการดูดซึมไนเตรตของพืช ซึ่งจะส่งผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสด้วย

การศึกษาผลของความเค็มต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในต้นข้าว 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวง พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ดอก พยอม พบว่าข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ตอบสนองต่อความเค็มแตกต่างกัน เมื่อได้รับเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้น 25 mM ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์กู้เมืองหลวง มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้น แต่แอคติวิตีจะลดลงเมื่อได้รับเกลือที่ความเข้มข้น 50, 75 และ 100 mM ส่วนพันธุ์ดอกพยอมมีแอคติวิตีต่ำสุดและต่ำในทุกความเข้มข้นเกลือ นอกจากนี้พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสสอดคล้องกับปริมาณของไนเตรตที่สะสมในใบ

แอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์ของข้าวโพด ที่ได้จากการฉีดเอนไซม์บริสุทธิ์ครั้งละ 25 ไมโครกรัม จำนวน 3 ครั้ง แอนติบอดีสามารถเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์และสารสกัดจากต้นกล้าข้าวโพดได้ รวมทั้งสารสกัดต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยวิธี Western blot ซึ่งแตกต่างจากการทำ Ouchterlony double immunodiffusion ที่สามารถตรวจพบเฉพาะแถบการตกตะกอนระหว่างแอนติบอดีกับสารสกัดจากต้นกล้าข้าวโพดเท่านั้น แต่ไม่สามารถตรวจพบปฏิกิริยาการตกตะกอนกับสารสกัดจากต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ได้

จากการศึกษาความเสถียรของสารสกัดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบว่าการเก็บรักษาเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสไว้ในเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ 40% พบแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสสูงที่สุด และการเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จะสามารถรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ได้นานกว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

จากการสกัดและทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 40% แล้วแยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G-25 ตามด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel และทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม พบว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสกึ่งบริสุทธิ์ของต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีขนาดโมเลกุลประมาณ 480 กิโลดาลตัน ซึ่งมีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดจากต้นกล้าข้าวโพดใน Western blot

Thesis Title	Effect of Salinity on Nitrate Reductase Activity in Rice Plants (*Oryza sativa* L.)
Author	Miss Pratum Ritthisunthorn
Major Program	Biochemistry
Academic Year	2003

Abstract

N_2 is an important macronutrient; plants absorb NO_3^--N from soil and utilized NO_3^- for plant growth. Nitrate acquisition is high or low depending on each plant species. The reduction of nitrate to nitrite is catalyzed by nitrate reductase which is rate-limiting in the nitrate assimilation process. Soil salinity is one problem which has influences upon nitrate uptake of plant that also affects nitrate reductase activity.

Salinity decreased nitrate reductase activity in three varieties of rice seedlings; namely Koomuangluang, Khaodokmali 105 and Dokpayom, espectially, at 50, 75 and 100 mM NaCl. The activity of nitrate reductase from Khaodokmali 105 seedling was highest. This result was similar to that found in nitrate accumulation in leaves.

Antibody to the purified nitrate reductase from corn seedling was produced by 3 injections of 25 µg purified enzyme. In western blotting, antibody showed cross reactivity with the purified nitrate reductase, corn seedling and Khaodokmali 105 seedling extracts. In contrast, Ouchterlony double immunodiffusion test showed only the precipitation of the antibody and corn seedling extract.

The stability of nitrate reductase in ammonium sulphate was tested and it was shown that at 40% saturation of ammonium sulphate, nitrate reductase activity was highest after storage at -20°C.

Nitrate reductase in Khaodokmali 105 seedlings was partially purified by precipitation in 0-40% saturation of ammonium sulphate followed by chromatography with Sephadex G-25 and DEAE-Sephacel. One major band of protein with M_r about

480 kDa was obtained from preparative polyacrylamide gel electrophoresis, corresponding with nitrate reductase from corn seedling in Western blot.