

การเปลี่ยนแปลงชีวเคมีบางประการของข้าวภายใต้สภาวะเครียดเกลือ

Some biochemical changes under salt stress in rice

ชุตินา โสมวงศ์ (Chutima Homwong)* ดร.กัลยา กองเงิน (Dr.Kanlaya Kong-ngern)**

บทคัดย่อ

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงชีวเคมีบางประการของข้าว อายุ 21 วัน ในต้นกล้า 3 พันธุ์คือ พอคคาลิ (พันธุ์ทนเค็ม) เหลืองอนันต์ (พันธุ์ทนเค็มปานกลาง) ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (พันธุ์ไม่ทนเค็ม) ที่ได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0 และ 12 เดซิซีเมนส์ต่อเมตร เป็นเวลา 10 วัน ผลจากการศึกษาพบว่า ความเค็มมีผลทำให้ค่าการรั่วไหลของอิเล็กโทรไลต์ ปริมาณโพรลีน ปริมาณสารมัลลอนไดอัลดีไฮด์ ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (สารที่บ่งชี้สภาวะเครียดเกลือ) และกิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่ต้านสารอนุมูลอิสระ ในข้าวทั้ง 3 พันธุ์เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยค่าต่างๆที่วัดได้จะตรงข้ามกับระดับการทนเค็มของข้าว นอกจากนี้ยังพบว่า พอคคาลิเป็นพันธุ์ที่ทนเค็มกว่าพันธุ์อื่นๆ จากความสามารถในการรักษาเสถียรภาพของเมมเบรนได้ดีที่สุด โดยค่าการรั่วไหลของอิเล็กโทรไลต์ที่วัดได้มีค่าน้อยสุด ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารมัลลอนไดอัลดีไฮด์ที่วัดได้น้อยสุด ผลจากการศึกษาบ่งชี้ได้ว่า พืชที่ทนเค็มมากจะมีกลไกหลายๆ กลไกในการลดการเกิดสารบ่งชี้สภาวะเครียดได้มากกว่าพันธุ์ไม่ทนเค็ม

ABSTRACT

Some biochemical changes under NaCl stress were studied in 21-day-old of 3 rice seedlings, namely Pokkali (salt-tolerant), Leuang Anan (LA; moderately salt-tolerant), Khao Dawk Mali-105 (KDML 105, salt-sensitive) which subjected to 0 and 12 dS m⁻¹ salinity levels for 10 days. The results show that salinity causes marked an increases in the percentage of electrolyte leakage and the contents of proline, malondialdehyde and hydrogen peroxide (salt stress indicators), and the activity of antioxidant enzyme (peroxidase) in all cultivars as compared with the controlled plants. All values were opposites to the level of salt tolerance in plant. Moreover, Pokkali was the most salt tolerance plant which depends on its ability to maintain membrane integrity and the lowest in the percentage of electrolyte leakage. This value also associated with the lowest in the content of malondialdehyde. As a result, more salt tolerance plant, more mechanisms to reduce salt stress indicators than less salt tolerance plants.

คำสำคัญ: ความเครียดเกลือ พืชทนเค็ม ความเครียดเกลือ

Key Word: salt stress, salt tolerance plant, salt stress

* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

** อาจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจและอาหารที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก โดยเฉพาะในทวีปเอเชียที่บริโภคข้าว เป็นอาหารหลักและเป็นแหล่งผลิตข้าวที่ใหญ่ที่สุดในโลก แต่ในปัจจุบันประชากรของโลกเพิ่มสูงขึ้น ความต้องการอาหารจะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย เกิดภาวะขาดแคลนอาหาร เนื่องจากผลผลิตจากการเพาะปลูกข้าวไม่เพียงพอต่อความต้องการเป็นผลมาจากพื้นที่เพาะปลูกส่วนใหญ่ประสบปัญหาสภาวะดินเค็ม ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างผลผลิตของข้าว ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ที่ปลูกข้าวเป็นหลัก และได้รับผลกระทบจากพื้นที่ดินเค็ม โดยเฉพาะในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งมีพื้นที่เพาะปลูกมากกว่าหนึ่งในสามของประเทศ และ 30 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่เพาะปลูกทั้งหมดเป็นพื้นที่ดินเค็ม ซึ่งผลผลิตที่ได้ในเขตพื้นที่ดินเค็มจะลดลงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตที่ควรจะได้ (กรมพัฒนาที่ดิน, 2540)

ความเค็มในดิน เป็นปัจจัยจำกัดการเจริญเติบโตของพืชหลายชนิด พืชภายใต้อิทธิพลของเกลือจะได้รับผลกระทบในด้านต่างๆ เช่น เกิดการขาดน้ำ พืชไม่สามารถนำน้ำไปใช้ประโยชน์ได้ เนื่องจากความเข้มข้นของเกลือในดินที่ส่งผลให้ค่าศักย์ของน้ำในดินลดต่ำกว่าในรากพืชเกิดความเครียดออสโมติก ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตต่ำลง เกิดความไม่สมดุลของน้ำและไอออนภายในเซลล์ เกิดความเป็นพิษของธาตุบางอย่างหรือขาดธาตุอาหารเนื่องจากสารละลายในดินมีความเข้มข้นของธาตุบางอย่างมากเกินไป ทำให้เกิดการขัดขวางการดูดธาตุอาหารที่จำเป็นต่อพืช เช่น ในสภาพดินเค็มพืชจะมีการสะสมโซเดียมทำให้พืชไม่สามารถลำเลียงแคลเซียม โพแทสเซียม และ แมกนีเซียม จึงทำให้เกิดอาการขาดธาตุอาหารดังกล่าวได้ (Hanson et al., 1994) และเกิดสารอนุมูลอิสระที่เป็นพิษต่อเซลล์พืชเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากกระบวนการหายใจ

ระดับเซลล์ ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาการรับอิเล็กตรอน (over reduction) ที่มากเกินไป ทำให้เกิดอนุมูลเหล่านี้ไปรวมตัวกับน้ำ หรือ ออกซิเจน เกิดเป็นสารอนุมูลอิสระเช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ อนุมูลเปอร์ออกซิล เป็นต้น ที่เป็นพิษต่อพืชสามารถทำลายความเสถียรของเมมเบรน โครงสร้างของโปรตีน ดีเอ็นเอในพืชได้ (Singer and Munns, 1992) ภายใต้สภาวะเครียดนี้พืชจะต้องมีการปรับตัวทั้งด้านสรีรวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี เพื่อช่วยให้พืชสามารถปรับตัวและอยู่รอดได้ เช่น มีกลไกการปิดของปากใบเพื่อลดการสูญเสียน้ำ การสร้างและสะสมสารในกลุ่ม compatible solutes เช่น โปรลีน ไกลซีน บีเทน กรดอินทรีย์ และน้ำตาล ภายในแวคิวโอลเพื่อช่วยปรับค่าศักย์ของน้ำภายในเซลล์ ทำให้พืชสามารถทนทานต่อสภาวะเครียดจากความเค็มได้ดี นอกจากนี้เมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียด พืชจะลดสภาวะเครียดด้วยการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระหรือเอนไซม์ออกซิเดเนส เพื่อป้องกันความเสียหายของอนุมูลอิสระที่เกิดกับเซลล์พืชซึ่งเป็นกลไกการปรับตัวของพืช มีทั้งการสร้างเอนไซม์และไม่เอนไซม์ ซึ่งจะมีอยู่ในเซลล์พืช เช่น เอนไซม์เพอร์ออกซิเดส เอนไซม์แคตาเลส เป็นต้น เพื่อทำลายอนุมูลอิสระและรักษาสมดุลของเซลล์พืช (McKersie, 1996; Hernández and Almansa, 2002) สำหรับการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่ต้านอนุมูลอิสระในต้นฝ้ายพันธุ์ทนเค็ม (Coker 312) พบว่าปริมาณของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส กลูตาไธโอนรีดักเตส มีปริมาณสูงขึ้นเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะเครียดเกลือความเข้มข้น 150 มิลลิโมล (Gossett et al., 1994) ดังนั้นการศึกษาด้านชีวเคมีที่พืชสร้างขึ้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อให้เข้าใจถึงกลไกการตอบสนองและการปรับตัวของพืชภายใต้สภาวะเครียดเกลือ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางด้านชีวเคมีของข้าวภายใต้สภาวะเครียดเกลือที่มีระดับการทนเค็มแตกต่างกัน เพื่อให้ได้องค์ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการปรับตัวทางทางด้านชีวเคมีของข้าว เพื่อนำไปสู่การศึกษาวิจัยในขั้นสูงต่อไป

อุปกรณ์และการทดลอง

ปลูกต้นกล้าข้าว 3 พันธุ์ที่มีระดับการทนเค็มที่แตกต่างกันคือ พอคกลี (พันธุ์ทนเค็ม) เหลืองอนันต์ (พันธุ์ทนเค็มปานกลาง) และข้าวขาวดอกมะลิ 105 (พันธุ์ทนเค็มน้อย) โดยนำเมล็ดข้าวไปแช่น้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเมล็ดไปปลูกบนกระຈาดที่วางอยู่บนถาดพลาสติก ความสูง 30 เซนติเมตร ความจุ 4 ลิตร ที่มีสารละลายธาตุอาหารพืช (Gregorio et al., 1997) คัดแปลงจาก Yoshida et al., 1976) จนต้นกล้าอายุ 21 วัน ทำการแบ่งข้าวแต่ละพันธุ์ออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0 และ 12 เดซิซีเมนส์ต่อเมตร เป็นเวลา 10 วัน ตามลำดับ แล้วทำการเก็บรักษาตัวอย่างต้นกล้าข้าว ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1. การวัดค่าการร้อยละของการรั่วไหลของอิเล็กโทรไลต์

วัดตามวิธีการของ Dionisio-Sese and Tobita (1998) โดยชั่งใบสดมา 0.1 กรัม ใส่หลอดฝาเกลียวขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นปราศจากไอออน 10 มิลลิลิตร แล้วนำหลอดตัวอย่างไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการวัดค่าการนำไฟฟ้าครั้งที่ 1 (EC_1) แล้วนำหลอดตัวอย่างไปเข้าเครื่องนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที แล้วทำการวัดค่าการนำไฟฟ้าครั้งที่ 2 (EC_2) คำนวณค่าร้อยละของการรั่วไหลของสารโดยใช้สูตร $EL (\%) = (EC_1/EC_2) \times 100$

2. ปริมาณสารมัลลอนอัลดีไฮด์ (MDA)

วัดการเกิดลิพิดเพอร์ออกซิเดชันในส่วนของใบโดยเปรียบเทียบจากปริมาณ สารมัลลอนไดอัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้น ใช้เทคนิคกรดไทโอบาบิทริก (thiobarbituric acid method) ของ Stewart and Bewley (1980) บดตัวอย่างใบ 0.1 กรัม ด้วยไนโตรเจนเหลวเดิม 50 มิลลิโมล ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0) ที่แช่เย็นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส 30 นาที ปิเปตสารละลายส่วนในสมา 1 มิลลิลิตร แล้วเติม 1 มิลลิลิตร ของ 0.5 เปอร์เซนต์ (w/v) กรดไทโอบาบิทริก (thiobarbituric acid) ที่ละลายใน 20 เปอร์เซนต์ (w/v) กรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid) ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส 30 นาที หยุดปฏิกิริยาในกระษะน้ำแข็ง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 และ 600 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสารมัลลอนอัลดีไฮด์ ให้มีหน่วยเป็น mM/gFW โดยใช้ค่า extinction coefficient เท่ากับ $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

3. ปริมาณสารโพรง

วัดปริมาณสารโพรง ตามวิธีการของ Bates et al. (1973) บดตัวอย่างใบ 0.1 กรัม ด้วยไนโตรเจนเหลวเดิม 3 เปอร์เซนต์ ซัลโฟซาลิไซลิกแอซิก (sulfosalicylic acid) 5 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2 ปิเปตสารละลายที่ได้ 1 มิลลิลิตร เติมสารผสมนินไฮดริน (นินไฮดริน 1.25 กรัมใน 30 มิลลิลิตร กรดอะซิติกและ 6 โมลลักรดฟอสฟอริก 20 มิลลิลิตร) 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 100 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาในกระษะน้ำเย็น เติมโทลูอิน (toluene) 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ดูดสารละลายบริเวณด้านบนเหนือผิวของโทลูอิน วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้โทลูอินเป็น blank นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานโพรงที่ใช้แอลโพรงในช่วงความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัม

4. ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

บดตัวอย่างใบ 0.1 กรัม ด้วยไนโตรเจนเหลว เดิม 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไตรคลอโรอะซิติก-แอซิก (trichloroacetic acid; TCA) จำนวน 1 มิลลิกรัม แล้วนำปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส 30 นาที เก็บสารละลายส่วนใส แล้วทำการวัดปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยปิเปต 10 มิลลิโมลฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0) จำนวน 500 ไมโครลิตร และ 1 โมล โพแทสเซียมไอโอไดด์ จำนวน 1 มิลลิกรัม แล้วปิเปตน้ำสกัดจนเกิดสีเหลืองที่อยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 3 มิลลิกรัม วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 390 นาโนเมตร คำนวณปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ให้มีหน่วยเป็น $\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}$ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ 0.03 เปอร์เซ็นต์ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 0, 1, 3, 5, 7 และ 9 ไมโครลิตร

5. กิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส

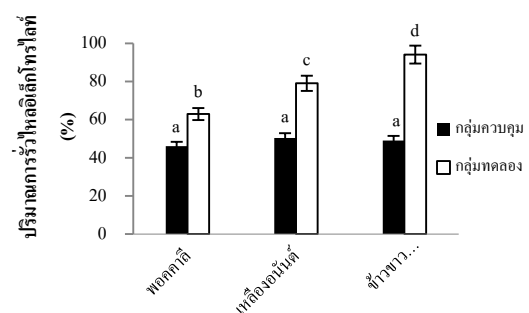
วัดกิจกรรมเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสตามวิธีการของ Chance and Machly (1955) ปิเปตตัวอย่างมา x ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 2582-x ไมโครลิตร เดิม 10 มิลลิโมล ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (pH 6.4) 300 ไมโครลิตร และ 8 มิลลิโมล กลูตาธione 24 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน เดิม 0.03 เปอร์เซ็นต์ H_2O_2 stock solution 94 ไมโครลิตร วัดค่าความยาวคลื่น 470 นาโน-เมตร นำแต่ละตัวอย่างมาทดสอบทีละตัวอย่าง โดยเติม 0.03% H_2O_2 stock solution จำนวน 94 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน แล้วนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงทันที เพื่ออ่านค่าดูดกลืนแสงที่ 15 และ 20 วินาที นำค่าดูดกลืนแสงทั้งสองเวลา ไปคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส ซึ่งมีหน่วยเป็น $\Delta A_{470} \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$

6. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SPSS version 16

ผลการทดลอง

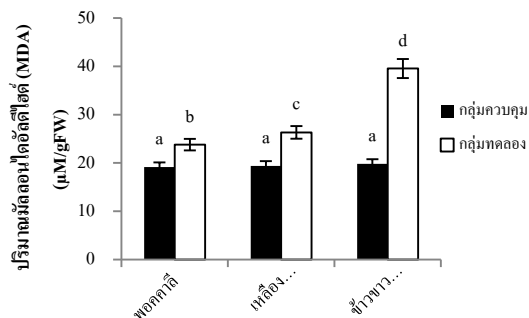
จากการวัดค่าการรั่วไหลของอิเล็กโตรไลต์ ปริมาณสารมัลลอนไดอัสไดไฮดริส ปริมาณโพรีน และปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เป็นสารบ่งชี้สภาวะเครียดเกลือและกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในส่วนของใบข้าวที่ปลูกในสภาวะเครียดเกลือ 12 เดซิซีเมนส์ต่อเมตร พบว่า ภายใต้สภาวะเครียดเกลือค่าการรั่วไหลอิเล็กโตรไลต์ในข้าวทุกพันธุ์จะเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีแนวโน้มที่จะได้รับผลกระทบมากที่สุดเนื่องจากค่าการรั่วไหลของอิเล็กโตรไลต์เพิ่มสูงถึง 94.9 % รองลงมาคือ เหลืองอนันต์ (79.04 %) และ พอคคาลิ (62.95 %) ผลจากการศึกษาพบว่า ค่าการรั่วไหล อิเล็กโตรไลต์ตรงข้ามกับระดับการทนเค็มของข้าว โดยพอคคาลิ (พันธุ์ทนเค็ม) ค่าการรั่วไหลอิเล็กโตรไลต์จะเกิดขึ้นน้อยกว่าพันธุ์เหลืองอนันต์ (พันธุ์ทนเค็มปานกลาง) และข้าวขาวดอกมะลิ 105 (พันธุ์ไม่ทนเค็ม) ตามลำดับ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ค่าร้อยละของการรั่วไหลของอิเล็กโตรไลต์ของต้นกล้าอายุ 21 วัน ในพอคคาลิ เหลืองอนันต์ ข้าวดอกมะลิ 105 ที่ได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 12 เดซิซีเมนส์ต่อเมตร เป็นเวลา 10 วัน

ผลกระทบของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเกิดลิปิดเพอร์ออกซิเดชันโดยวัดจากปริมาณสารมัลลอน-ไดอัสไดไฮดริส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ ลิปิดเพอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันภายในเซลล์ ใช้วิธี thiobarbituric acid method ของ

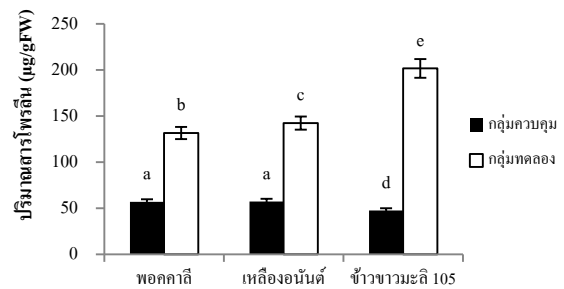
Stewart and Bewley (1980) พบว่าเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะเครียดเกลือที่ความเข้มข้น 12 เดซิซีเมนต์ต่อเมตร ปริมาณสารมัล-ลอนไดออกไซด์จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในทุกพันธุ์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่า ภายใต้สภาวะเครียดเกลือ พันธุ์พอคคาลิและเหลืองอนันต์มีปริมาณมัลลอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ปริมาณสารมัลลอนไดออกไซด์ (MDA)

(μM/gFW) ของต้นกล้าอายุ 21 วัน ในพอคคาลิ เหลืองอนันต์ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 12 เดซิซีเมนต์ต่อเมตร เป็นเวลา 10 วัน

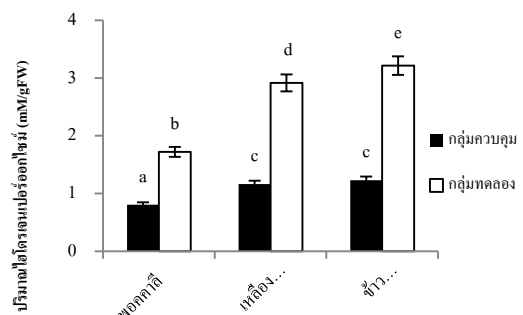
ในกลุ่มควบคุมทุกพันธุ์มีการสะสมโปรตีนในระดับต่ำ ซึ่งปริมาณโปรตีนใน พอคคาลิ เหลืองอนันต์ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 คือ 56.9, 58.7, 47.6 μM/gFW ตามลำดับ ในกลุ่มที่อยู่ภายใต้ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 12 เดซิซีเมนต์ต่อเมตร ใบข้าวจะมีการสะสม โปรตีนในปริมาณที่สูงขึ้น มีปริมาณโปรตีนในพอคคาลิ เหลืองอนันต์ ข้าวขาวมะลิ 105 คือ 131.6, 142.4, 201.7 μM/gFW ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นในพอคคาลิ เหลืองอนันต์ และ ข้าวขาวดอกมะลิ เป็น 2.3, 2.4, 4.2 เท่า ตามลำดับ ซึ่งปริมาณโปรตีนมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเมื่อระดับความเค็มของพืชลดลงหรือพืชที่มีความไวต่อเกลือ (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ปริมาณโปรตีน (μM/gFW) ของต้นกล้าอายุ

21 วัน ในพอคคาลิ เหลืองอนันต์ ข้าวดอกมะลิ 105 ที่ได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 12 เดซิซีเมนต์ต่อเมตร เป็นเวลา 10 วัน

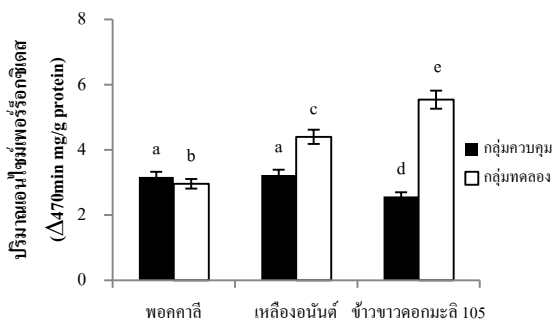
จากการทดลองเห็นได้ชัดว่าภายใต้สภาวะเครียดเกลือ 12 เดซิซีเมนต์ต่อเมตร ปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในทุกพันธุ์ กลุ่มทดลองของทั้ง 3 พันธุ์ คือ พอคคาลิ เหลืองอนันต์ และข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เท่ากับ 1.72, 2.92, 3.21 mM/gFW ตามลำดับ ซึ่งในพันธุ์เหลืองอนันต์ (ทนเค็มปานกลาง) และข้าวขาวดอกมะลิ (ทนเค็มน้อย) เมื่อได้รับความเครียดเกลือจะมีการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปริมาณที่สูงมากกว่าพันธุ์พอคคาลิ ซึ่งปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะขึ้นอยู่กับระดับการทนเค็ม (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (mM/gFW)

ของต้นกล้าอายุ 21 วัน ในพอคคาลิ เหลืองอนันต์ ข้าว-ดอกมะลิ 105 ที่ได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 12 เดซิซีเมนต์ต่อเมตร เป็นเวลา 10 วัน

กิจกรรมเอนไซม์เพอร์ร็อกซิเดสในพอคคาลิ ลดลงเล็กน้อย โดยในกลุ่มควบคุมของพอคคาลิมี กิจกรรมเอนไซม์เพอร์ร็อกซิเดสเท่ากับ $3.17 \text{ units min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$ และ ในกลุ่มทดลองมีกิจกรรมเอนไซม์ เพอร์ร็อกซิเดสเท่ากับ $2.96 \text{ units min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$ ซึ่ง ลดลง $0.21 \text{ units min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$ ในทางกลับกัน รูปแบบการเปลี่ยนแปลงของเหลืองอนันต์ (ทนเค็มปาน กลาง) และข้าวขามะลิ 105 (ไม่ทนเค็ม) มีรูปแบบที่ คล้ายคลึงกัน โดยในกลุ่มทดลองมีกิจกรรมเอนไซม์ เพอร์ร็อกซิเดสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ปริมาณกิจกรรมเอนไซม์เพอร์ร็อกซิเดส

($\Delta 470 \text{ min mg}^{-1} \text{ protein}$) ของต้นกล้า อายุ

21 วัน ใน พอคคาลิ เหลืองอนันต์ ข้าวดอกก มะลิ 105 ที่ได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์ความ เข้มข้น 12 เดซิซิเมนส์ต่อเมตร เป็นเวลา 10 วัน

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลกระทบที่เป็นอันตรายของโซเดียมคลอไรด์ต่อพืชส่งผลให้เกิดการขาดน้ำ ทำให้เกิดความเครียดออกซิเดติกและการสะสมโซเดียมไอออน ส่วนเกินไว้ในเซลล์ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของพืช

เมื่อพืชได้รับผลกระทบจากความเค็มในดิน เชื้อเห็ดเซลล์จะได้รับความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระจึงส่งผลต่อการรั่วไหลของอิเล็กโทรไลต์ภายในเซลล์ออกมาสู่ภายนอกเซลล์เพิ่มมากขึ้น (Madhava-Rao and Sresty, 2000) จากการทดลองพบว่า ข้าวทั้งสาม

พันธุ์มีค่าการรั่วไหลของอิเล็กโทรไลต์เพิ่มมากขึ้นเมื่อ อยู่ภายใต้สภาวะเครียดเกลือ ในกลุ่มควบคุมไม่มีความ แตกต่างระหว่างพันธุ์ แต่เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะเครียด เกลือเชื้อเห็ดของข้าวขามะลิ 105 จะถูกทำลายมากที่สุด รองลงมาคือ เหลืองอนันต์ แต่พอคคาลิได้รับความเสียหายเพียงเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพอคคาลิสามารถรักษาเสถียรภาพของเมมเบรนได้ดีกว่า เหลืองอนันต์และข้าวขามะลิ 105 จากการทดลอง ปริมาณมัลลอนไดออกไซด์ของพอคคาลิในระดับต่ำ สอดคล้องกับค่ารั่วไหลอิเล็กโทรไลต์ อาจจะเป็นไปได้ว่า ปริมาณของค่าการรั่วไหล อิเล็กโทรไลต์และปริมาณ สารมัลลอนไดออกไซด์เกี่ยวข้องกับการทนเกลือของ พอคคาลิ ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Dhindsa et al. (1981) ที่รายงานว่าระดับของลิปิดเปอร์ออกซิเดสและ ค่าการรั่วไหลอิเล็กโทรไลต์จะมีการเปลี่ยนแปลงที่ คล้ายคลึงกันในใบยาสูบเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะเครียด เกลือ นอกจากนี้ Lutts et al. (1996) ยังพบว่า ปริมาณมัล ลอนไดออกไซด์ในข้าวพันธุ์ทนเค็ม (Nona Bokra และ IR4630) มีปริมาณน้อยกว่าพันธุ์ที่ไวต่อเกลือและค่าการ รั่วไหลอิเล็กโทรไลต์และปริมาณมัล-ลอนไดออกไซด์ จะมีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญ

จากการรายงานที่ผ่านมาการศึกษากลไกการ ปรับตัวของพืชต่อความเครียดเกลือมีการสะสมสาร บางอย่างไว้ในเซลล์ เพื่อให้เซลล์เข้าสู่สมดุล เช่น การสะสมกรดอะมิโนโพรลีน ทำหน้าเป็นสารประเภท compatible solutes พืชจะสังเคราะห์ขึ้นมาใน สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม โดยจะช่วยรักษาระดับ water potential และ osmotic pressure ภายในเซลล์ (Lin et al., 2002) เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะเครียดเกลือ โพรลีนจะเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายภายใน เซลล์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้น้ำจากภายนอกสามารถแพร่เข้า ภายในเซลล์ได้ หรือการลดน้ำจากภายในเซลล์แพร่ออก ภายนอกเซลล์ (ศรีนญา กลทรงคุณากร, 2550; Lee and Liu, 1999; Khatkar and Kuhad, 2000) จากการทดลอง พบว่า พอคคาลิจะมีการสะสมโพรลีนในปริมาณที่ต่ำ กว่า เหลือง-อนันต์และข้าวขามะลิ 105 ซึ่งสอดคล้อง

กับการศึกษาของ Theerakulpisut et al. (2005) รายงานว่า พอคคลี (ทนเค็ม) จะมีการสะสมโพรลีนระดับต่ำที่รากและใบ แต่ IR29 ที่ไม่ทนเค็มจะมีปริมาณโพรลีนสูงสุด และ พันธุ์เหลืองตาโม แดงดอกกก และ สุพรรณบุรี2 ที่ทนเค็มปานกลางจะมีการสะสมโพรลีนในระดับปานกลาง

ผลกระทบของความเค็มต่อการสะสมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ กิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส ที่ได้ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือ ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในพอคคลีและเหลืองอนันต์จะมีปริมาณต่ำกว่าในข้าวขาวดอกมะลิ 105 สอดคล้องกับการรายงานของ Uchida et al. (2002) ว่าข้าวพันธุ์พอคคลี และ เหลืองอนันต์ ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ทนเค็ม และ ทนเค็มปานกลางตามลำดับจะมีการสร้างสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ต่ำกว่าข้าวพันธุ์ข้าวขาวมะลิ 105 และ PT 60 แต่รูปแบบของการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสในพอคคลีจะแตกต่างจากเหลืองอนันต์และข้าวขาวมะลิ 105 เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะเครียดเกลือกิจกรรมเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสในพอคคลีจะลดลงเล็กน้อยแต่ในเหลืองอนันต์และข้าวขาวมะลิ 105 จะมีกิจกรรมเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานในพืชชนิดอื่น เช่น ใบยาสูบ กิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส จะเพิ่มในพันธุ์ Bright Yellow 2 (BY-2) ที่ไวต่อเกลือที่ความเข้มข้น 400 mM NaCl (Bueno et al., 1998) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าแนวโน้มของปริมาณการเกิดกิจกรรมเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสเพิ่ม สูงขึ้นตามปริมาณการสร้างสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เนื่องจาก กิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสมีหน้าที่ในการทำลายอนุมูลอิสระที่พืชสร้างขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกองทุนพัฒนาและส่งเสริมด้านวิชาการของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2557 วงศ์ที่ 2 ที่ให้ทุนในการจัดทำบทความและ กลุ่มวิจัยข้าวทนเค็ม ภาควิชาชีววิทยา คณะ

วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ได้สนับสนุนทุนการศึกษาและการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- กรมพัฒนาที่ดิน. 2540. การจัดการดินเค็ม. กรมพัฒนาที่ดิน. กระทรวงเกษตร และ สหกรณ์ กรุงเทพฯ.
- ศรีนญา กลทรงคุณากร. เมแทบอลิซึมของโพรลีนภายใต้สภาวะความเค็มและการฟื้นจากความเครียดในยูคาลิปตัส. 2550. วิทยาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Bates, L., Waldren, R.P. and Teare I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*. 39: 205-207.
- Bueno, P., Piqueras, A., Kurepa, J., Savoure, A., Verbruggen, N., Montagu, V.M. and Inze, D. 1998. Expression of antioxidant enzymes in response to abscisic acid and high osmoticum in tobacco BY-2 cell cultures. *Plant Sci*. 138: 27-34
- Chance, B. And Maehly, A.C. 1955. Assay of catalase and peroxidases. *Methods Enzymol*. 2: 764-775.
- Dhindsa, R.H., Plumb-Dhindsa, R. and Thorpe, T.A. 1981. Leaf senescence correlated with increased level of membrane permeability, lipid peroxidation and decreased level of SOD and CAT. *J. Exp. Bot*. 32: 93-101.
- Dionisio-Sese, M.L. and Tobita, S. 1998. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Sci*. 135: 1-9.
- Gossett, D.R., Millhollon, E.P. and Lucas, M.C. 1994. Antioxidant response to NaCl treatment in salt tolerant and sensitive cultivars of cotton, *Gossypium hirsutum* L. *Crop Sci*. 34: 706- 714.

- Gregorio, G.B., Dharmawansa, S. and Mendoza, R.D. 1997. Screening rice for salinity tolerance. IRRI Discussion Paper Series No. 22 pp 2-23. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.
- Hanson, A.D., Rathinasabapathi, B., Rivoal, J., Burnet, M., Dillon, D.O. and Gage, D.A. 1994. Osmoprotective compounds of the Plumbaginaceae: a natural experiment in metabolic engineering of stress tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91: 306-310.
- Hernández, J.A. and Almansa, M.S. 2002. Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relation of pea leaves. *Physiol Plantarum*. 155: 251-352.
- Khatkar, D. and Kuhad, M.S. 2000. Short-term salinity induced changes in two wheat cultivars at different growth stages. *Biol. Plant*. 43: 629-632.
- Lee, T.M. and Liu, C.H. 1999. Correlation of decreased calcium contents with proline accumulation in the marine green macroalga *Ulva fasciata* exposed to elevated NaCl contents in seawater. *J. Exp. Bot.* 50: 1855-1862.
- Lin, S.J., Kaeberlein, M., Andalis, A.A., Sturtz, L.A., Defossez, P.A., Culotta, V.C., Fink, G.R. and Guarente, L. 2002. Calorie restriction extends life span by shifting carbon toward respiration. *Nature*. 418: 344-348.
- Lutt, S., Kinet, J. and Bouharmont, J. 1996. NaCl induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa*) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of Botany*. 78: 389-398.
- Madhava-Rao, K.V. and Sresty, T.V.S. 2000. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Sci*. 157: 113-128.
- McKersie, B.D. 1996. Oxidative stress. Available source: <http://www.agronomy.psu.edu/Courses/AGRO518/Oxygen.html>.
- Munns, R. 2002. Comparative Physiology of Salt and Water Stress, *Plant Cell and Environment*, 25: 239-250.
- Singer, M.J. and Munns, D.N. 1992. Soils: an introduction. 2nd ed. Macmillan, New York.
- Stewart, R.R-C. and Bewley, J.D. 1980. Lipid peroxidation associated aging of soybean axes, *Plant Physiology*. 65: 245-248.
- Summart, J., Thanonkeo, P., Panichajakul, S., Prathepha, P. and McManus, M.T. 2010. Effect of salt stress on growth, inorganic ion and proline accumulation in Thai aromatic rice, Khao Dawk Mali 105, callus culture. *African Journal of Biotechnology*. 9(2): 145-152.
- Theerakulpisut, P., Bunnag, S. and Kong-Ngern, K. 2005. Genetic diversity, salinity tolerance and physiological responses to control of NaCl of six rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Asian J. Plant Sci*. 4: 562-573.
- Uchida, A., Jagendorf, A.T., Hibino, T., Takabe, T. and Takabe, T. 2002. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Sci*. 163: 515-523.
- Yoshida, S., Forno, D.A., Cock, J.H. and Gomez, K.A. 1976. Laboratory manual for physiological studies of rice. Philippines.