

อิทธิพลของความเข้มแสงต่อสรีรวิทยาบางประการ และการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในใบข้าวเหนียวดำ

Effect of Light Intensity on Some Physiological Parameters and Protein Change in Leaves of Black Glutinous Rice

กัญญกาญจน์ พูนศิริ (Kunyakarn Phoonsiri)* ดร.กัลยา กองเงิน (Dr.Kanlaya Kong-ngern)**

บทคัดย่อ

แสงเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการสร้างผลผลิตของข้าว ศึกษาผลของความเข้มแสงต่อสรีรวิทยาบางประการและการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนด้วยเทคนิคเอสดีเอสพอลิอะคริลาไมด์อิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE) ในใบข้าวเหนียวดำในระยะต้นกล้า โดยปลูกต้นกล้าในสารละลายธาตุอาหารนาน 30 วัน จากนั้นแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ให้แสงตามธรรมชาติ (52,500 ลักซ์) และกลุ่มที่ได้รับความเข้มแสงต่ำ (2,500 และ 800 ลักซ์) ด้วยตาข่ายพรางแสงเป็นเวลา 14 วัน ผลการทดลองพบว่า ภายใต้สภาวะที่ได้รับความเครียดแสงต่ำ ปริมาณแอนโทไซยานิน และค่าความเขียวใบลดลง ขณะที่การรั่วไหลของอิเล็กโตรไลต์ ปริมาณสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ ปริมาณโปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มมากขึ้น จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายใต้สภาวะเครียดแสง พบความเข้มของแถบโปรตีนขนาด 28 และ 153 กิโลดาลตันลดลง ขณะที่โปรตีนขนาด 23 กิโลดาลตันมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ABSTRACT

Light intensity is an important factor affected rice growth and productivity. The effect of light intensity on some physiology and protein change using SDS-PAGE of black glutinous rice at seedling stage was studied. Seeds were hydroponically grown for 30 days then divided into 2 groups: grow under natural light condition (52,500 lux) and under low light condition (2,500 and 800 lux) by using shaded net for 14 days. The results showed that under low light conditions caused a decrease anthocyanin content and leaf greenness values (SPAD). While, causes marked increase electrolyte leakage, malondialdehyde content, proline content and peroxidase enzyme activity. The intensity of 28 and 153 kDa polypeptide band markedly decreased in light-treated plant. Whereas, an increased accumulation of 23 kDa polypeptide band was found in leaves as compared with control groups.

คำสำคัญ: ข้าวเหนียวดำ ความเข้มแสง โปรตีน

Key words: black glutinous rice, light intensity, protein

*นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**อาจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

ข้าวเหนียวดำ (black glutinous rice) หรือ ข้าวก่ำ เป็นข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีม่วงแดงจนถึงสีดำ เรียกว่า แอนโทไซยานิน (anthocyanins) ซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีคุณสมบัติเป็นสารแอนติออกซิแดนท์ (antioxidant) ที่ช่วยกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในพืช มีรายงานว่า การแสดงออกของสารสีในส่วนต่างๆ ของข้าวเหนียวดำนอกจากมีพันธุกรรมเข้ามากำหนดแล้วยังมีเงื่อนไขของสภาพแวดล้อมเข้ามามีอิทธิพลต่อการปรากฏของสารสี เช่น อุณหภูมิ และแสง จากดวงอาทิตย์ เป็นต้น (Gross, 1987) ทำให้การสะสมสารสีในเมล็ดข้าวเหนียวดำพันธุ์ต่างๆ มีทั้งที่เป็นทั้งเมล็ด ก่ำดำหรือก่ำครึ่งซีก

ในปัจจุบันปัจจัยทางกายภาพเปลี่ยนไปมากส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโต และการสร้างผลผลิตของพืช โดยเฉพาะปัจจัยหลักเช่น ความเข้มแสง (light intensity) ความเข้มแสงที่สูงหรือต่ำเกินไปนอกจากจะมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงในช่วงการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในระบบแสงสอง (photosystem II; PSII) โดยไปรบกวนศูนย์กลางปฏิกิริยาแสง (photosynthetic reaction center) (Jones and Kok, 1966) และทำให้อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงลดลง (Critchley, 1981) ภายใต้สภาวะเครียดจากแสงจะเกิดความไม่สมดุลระหว่างการรับแสงและการใช้ประโยชน์จากแสง (Huner et al., 1998) พืชจะสร้างสารอนุมูลอิสระขึ้น (reactive oxygen species) ซึ่งสารดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็นตัวออกซิไดซ์อย่างรุนแรงจนสามารถทำลายสารชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น ดีเอ็นเอ โปรตีน เชื้อหุ้มเซลล์ ตลอดจนเชื้อหุ้มคลอโรพลาสต์ การเสียสภาพของเชื้อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการรั่วไหลของสารอิเล็กโตรไลต์ออกจากเซลล์ ปริมาณสารที่บ่งชี้ถึงสภาพเครียดของพืชที่เพิ่มขึ้น ส่วนหนึ่งเกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde) ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากปฏิกิริยาการปิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ที่เกิดจากการทำลายกรดไขมันไม่อิ่มตัวอันเป็นองค์ประกอบของเชื้อหุ้มเซลล์ กลไกที่ช่วยลดความเสียหายอันเนื่องมาจาก

แสง ได้แก่ การสร้างสารมาค้ำจัดอนุมูลอิสระในเซลล์ เช่น สร้างเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) คตะเลส (catalase) เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) และเพิ่มการสะสมสารที่ช่วยปรับสมดุลออสโมติกภายในเซลล์ (compatible solute) เช่น โปรลีน น้ำตาล เป็นต้น มีรายงานว่า แอนโทไซยานินในพืชจะช่วยปกป้องเซลล์จากสภาพแสงที่ผิดปกติ (Steyn et al., 2002) โดยจะช่วยกรองแสงไม่ให้ส่องทะลุผ่านเข้าไปในเนื้อเยื่อพืชและช่วยป้องกันอันตรายจากแสงที่จะไปทำลายคลอโรพลาสต์ซึ่งเป็นรงควัตถุสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (Close and Beadle, 2003; Hada et al., 2003) ช่วยกำจัดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (Gould et al., 2002) และยังช่วยปรับสมดุลของน้ำภายในเซลล์เมื่อเกิดสภาวะเครียดเกลือ (Chutipaijit et al., 2011) และสภาวะขาดน้ำ (วัฒนา, 2552)

แสงมีผลโดยตรงต่อการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานิน (Jaakola et al., 2004) ทั้งนี้เนื่องจากแสงเป็นตัวส่งสัญญาณไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ เช่น เอนไซม์ฟีนอลอะลานีน แอมโมเนีย-ไลเอส ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีการสังเคราะห์ (Arakawa et al., 1986; ยุทธนา, 2549) และชักนำการแสดงออกของยีนในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Mol, 1996; Jaakola, 2013; Feng et al., 2013) เมื่อแสงลดต่ำลงจะเกิดการยับยั้งกระบวนการถอดรหัสของยีนในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Fujita, 2007) ปัจจุบันมีการศึกษาผลของแสงต่อการสะสมสารแอนโทไซยานินในพืชหลากหลายชนิด อาทิเช่น ข้าวโพด (Singh et al., 1999) มันเทศ (Islam et al., 2005) ฤๅษีผสม (Nguyen and Cin, 2009) พืชเนย (Albert et al., 2009) อย่างไรก็ตาม การศึกษาผลของแสงในข้าวยังไม่เป็นที่แน่ชัดและยังมีการศึกษาในด้านนี้น้อยมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาผลของความเข้มแสงต่อการสร้างและสะสมสารแอนโทไซยานินตลอดจนการเปลี่ยนแปลงแบบแผนของโปรตีนในใบข้าวเหนียวดำ เพื่อเป็นข้อมูลในการนำไปประยุกต์ใช้ปรับปรุงพันธุ์ และหาวิธีป้องกันพืชไม่ให้เกิดความเสียหายเมื่ออยู่ในสภาวะเครียดแสง

วิธีการวิจัย

1. ตัวอย่างพืชและการทดลอง

เมล็ดพันธุ์ที่ใช้ศึกษาเป็นข้าวเหนียวดำใบสีม่วง (Br.no.51) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวชุมแพ จังหวัดขอนแก่น ทำการศึกษาในระยะต้นกล้าระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนมีนาคม 2555 ในโรงเรือนภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น คัดเลือกเมล็ดพันธุ์ที่สมบูรณ์แช่เมล็ดจนงอกแล้วย้ายไปปลูกบนถาดเพาะขนาด 7×23 เซนติเมตร ที่รองพื้นด้วยตาข่ายและวางอยู่บนถังพลาสติกสีดำขนาด 20×17 เซนติเมตร ที่บรรจุสารละลายธาตุอาหาร 3 ลิตร (Gregorio et al., 1997) คัดแปลงจากสูตรของ Yoshida et al, 1976) ทำการเปลี่ยนสารละลายธาตุอาหารทุก 7 วัน จนต้นกล้าอายุได้ 30 วัน จึงแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มควบคุม (Control; C) ให้แสงตามสภาพปกติตลอดการทดลอง มีความเข้มแสงเฉลี่ย 52,500 ลักซ์ (วัดในช่วงเที่ยงวันด้วยเครื่อง Walk LAB LUX Meter) และกลุ่มพรางแสงด้วยตาข่ายพรางแสงสีดำ 1 และ 2 ชั้น มีความเข้มแสงเฉลี่ย 2,500 และ 800 ลักซ์ (Treatment; T1 และ T2) ตามลำดับ นาน 14 วัน หลังจากนั้นเก็บและทำความสะอาดตัวอย่าง แล้วนำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส สำหรับนำไปวิเคราะห์ค่าต่างๆ ต่อไป

2. วัดค่าสรีรวิทยาบางประการ

2.1) การวัดปริมาณแอนโทไซยานิน

ชั่งใบข้าว 0.1 กรัม ใส่ในหลอดทดลองเติม acidified ethanol ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ดูดสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร โดยใช้ acidified ethanol เป็น blank คำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานินตามวิธีการของ Abdel-Aal and Hucl (1999)

2.2) การวัดค่าความเขียวใบ (SPAD)

เลือกใบข้าวใบที่สอง (นับจากปลายยอด) ที่ทางเต็มที่ เช็ดทำความสะอาด วัดด้วยเครื่องคลอโรฟิลล์มิเตอร์ (SPAD-502 Plus) โดยกำหนดให้ตำแหน่งที่วัด

ห่างจากปลายใบประมาณ 1 นิ้ว แล้วเลือกวัด 3 ตำแหน่ง (ต้น กลาง และปลายใบ) เพื่อให้ได้ค่าเฉลี่ยทั้งใบ

2.3) การรื้อไหลของสารอิเล็กโทรไลต์

ชั่งใบข้าวมา 0.1 กรัม ตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มีน้ำปราศจากไอออน 10 มิลลิลิตร นำหลอดตัวอย่างไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วัดค่าการนำไฟฟ้าโดยใช้เครื่อง conductivity meter ครั้งที่ 1 จากนั้นทำให้เซลล์เสียหายโดยนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปวัดค่าการนำไฟฟ้าอีกครั้ง คำนวณเปอร์เซ็นต์การรื้อไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ตามวิธีการของ Dionisio-Sese and Tobita (1998)

2.4) ปริมาณสารมาลอนไดอัลดีไฮด์

วัดการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันโดยคัดแปลงจากวิธีของ Stewart and Bewly (1980) โดยวัดจากปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้น โดยมีวิธีการดังนี้คือ บดตัวอย่างใบข้าว 0.1 กรัม ด้วยโกร่งที่เติมน้ำไตรเจนเหลว แล้วเติมบัฟเฟอร์สกัด [50 mM phosphate buffer (pH 7.0)] จำนวน 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำของเหลวที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที บันทึกปริมาตรที่ได้และดูดสารสกัดตัวอย่างจำนวน 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.5 มิลลิลิตรของ 0.5 เปอร์เซ็นต์ กรดไทโอบาร์บิทริก (thiobarbituric acid; TBA) ที่ละลายใน 20 เปอร์เซ็นต์ของกรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid; TCA) นำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที หยุดปฏิกิริยาทันทีในถังน้ำแข็ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 และ 600 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณตามสูตรของ Stewart and Bewly (1980)

2.5) การวัดปริมาณโพรลีน

ชั่งใบข้าว 0.1 กรัม แล้วบดให้ละเอียดด้วยโกร่งที่เติมน้ำไตรเจนเหลว จากนั้นเติม 3 เปอร์เซ็นต์ของกรดซัลโฟซาลิไซลิก (sulfosalicylic acid) ปริมาตร

5 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 บันทึกปริมาตรทั้งหมด และดูดสารที่กรองได้ 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายของกรด นินไฮดริน (acid ninhydrin) จำนวน 2 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในถังน้ำแข็ง จากนั้นเติมทูลูอิน (toluene) จำนวน 4 มิลลิลิตร ผสมสารละลาย แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ดูดสารละลายบริเวณด้านบนเหนือผิวของทูลูอิน ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้ทูลูอินเป็น blank จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานโพรตีนตามวิธีการของ Bates et al. (1973)

2.6) กิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

วัดกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส คัดแปลงจากวิธีของ Chance and Maehly (1995) โดยชั่งใบข้าว 0.1 กรัม แล้วนำมาบดให้ละเอียดด้วยโกร่งที่วางบนกระบนน้ำแข็งใช้ในโตรเจนเหลวช่วยในการบด จากนั้นเติมบัฟเฟอร์สกัด [50 mM phosphate buffer (pH 7.0)] จำนวน 400 ไมโครลิตร บดต่อจนเป็นของเหลว ย้ายใส่ในหลอดไมโครทิวป์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ดูดเอาสารสกัดส่วนใสย้ายใส่หลอดใหม่ จากนั้นเตรียมตัวอย่างเพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดย ดูดสารสกัดมา 2 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดแก้วขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 2850 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ (KP buffer pH 6.4) จำนวน 300 ไมโครลิตร และ 8 มิลลิโมลาร์ กลูตาอิก (glutathione) จำนวน 24 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารหลอดที่เป็น blank ให้ใช้น้ำกลั่นแทนน้ำตัวอย่าง แล้วเติม 10 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ จำนวน 300 ไมโครลิตร และ 8 มิลลิโมลาร์ กลูตาอิก 24 ไมโครลิตร ท้ายสุดเติม 0.03 เปอร์เซ็นต์ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จำนวน 94 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร จับเวลาทันทีหลังจากนำเข้าเครื่อง อ่านค่าที่ 15

และ 20 วินาที บันทึกค่าแล้วนำไปคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

2.7) การวัดปริมาณโปรตีน

วัดปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976) หาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างเพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบการศึกษากิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดย ดูดสารสกัดตัวอย่างมา 1 ไมโครลิตร (จากการสกัดเอนไซม์ข้างต้น) แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 20 ไมโครลิตร ตามด้วย Dry concentrate (Bio-Rad) จำนวน 1000 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 15-30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น blank เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

3. การศึกษาแบบแผนของโปรตีน

3.1) การเตรียมตัวอย่างและสกัดโปรตีน

นำใบข้าวมาบดในโกร่งที่แช่นบนกระบนน้ำแข็งเติมในโตรเจนเหลวช่วยในการบด จากนั้นเติม 0.1 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate; SDS) ย้ายของเหลวที่ได้ใส่หลอดไมโครทิวป์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบน มาตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตน (acetone) เย็นจัด นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นละลายตะกอนด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต เก็บตัวอย่างที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ส่วนใบบางส่วนนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณโปรตีนเทียบกับโปรตีนมาตรฐานตามวิธีการของ Bradford (1976)

3.2) การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

นำตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้ 10 ไมโครกรัม มาผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 5 เท่า (5x loading buffer) ปรับปริมาตรให้เท่ากันทุกตัวอย่าง

โดยการเติมน้ำ นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำมาแยกโดยเทคนิค SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis ที่ประกอบด้วย 12 เปอร์เซ็นต์ separating gel โดยให้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ด้วยเครื่อง Power Pac 3000 (Bio-Rad) ขนาดของเจลที่ใช้ในการแยกคือ 7×10 เซนติเมตร หลังจากนั้น ย้อมแถบโปรตีนด้วยซิลเวอร์ไนเตรท

4. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) จำนวน 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยใช้โปรแกรม Excel นำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ผลด้วยวิธี Analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 17 ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ผลการวิจัย

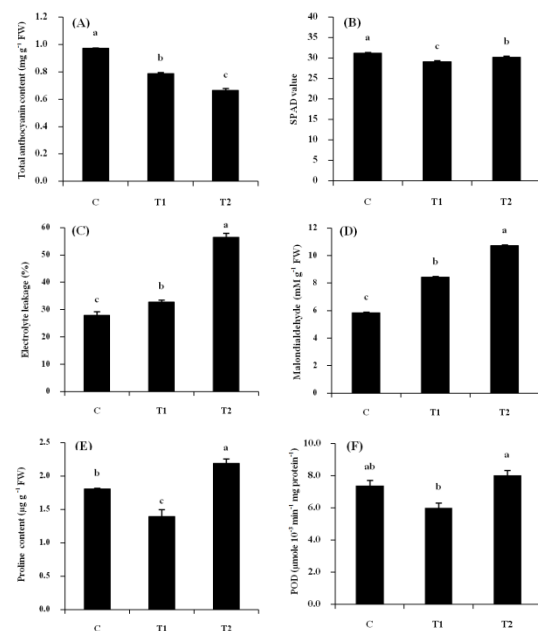
1. ผลของความเครียดแสงต่อค่าสรีรวิทยาบางประการ

การพรางแสงด้วยตาข่ายพรางแสง 1 และ 2 ชั้น ทำให้ค่าความเข้มแสงลดลงเท่ากับ 2,500 และ 800 ลักซ์ ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า ระดับความเข้มแสงที่ลดลงมีผลทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินในใบข้าวเหนียวลดลง 19 และ 32 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$) ตามลำดับ (ภาพที่ 1A) ในขณะที่เดียวกันค่าความเขียวของใบลดลงเช่นกัน แต่ในกลุ่มที่พรางแสง 1 ชั้น กลับทำให้ค่าความเขียวลดลงมากกว่า 2 ชั้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$) โดยเปอร์เซ็นต์การลดลงเป็น 7 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 1B) ในสภาพที่ความเข้มแสงลดลงทำให้การรั่วไหลของอิเล็กโทรไลต์ และปริมาณสารมาลอนไดอัลดีไฮด์มีค่าเพิ่มมากขึ้นจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีเปอร์เซ็นต์การรั่วไหลของอิเล็กโทรไลต์เพิ่มขึ้น 5 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 1C) และปริมาณสารมาลอนไดอัลดีไฮด์เพิ่มขึ้นเป็น 44 และ 83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 1D) ในขณะเดียวกันพบว่า ปริมาณ

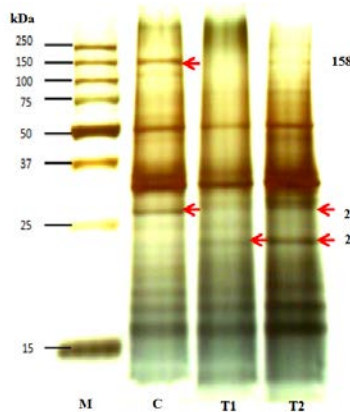
โพรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่พรางแสง 2 ชั้น และมีค่าลดลงในกลุ่มที่พรางแสง 1 ชั้น โดยมีปริมาณโพรตีนเพิ่มขึ้นเป็น 21 เปอร์เซ็นต์ (T2) และมีค่าลดลง 23 เปอร์เซ็นต์ (T1) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$) (ภาพที่ 1E) จากการวิจัยยังพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้น 14 เปอร์เซ็นต์ (T2) และมีค่าลดลง 14 เปอร์เซ็นต์ (T1) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$) (ภาพที่ 1F)

2. ผลการศึกษาแบบแผนโปรตีนในสภาวะเครียดแสง

จากการศึกษาเปรียบเทียบแบบแผนของโปรตีนในใบข้าวเหนียวค่าเมื่อได้รับความเข้มแสงต่ำ 2 ระดับ พบความแตกต่างของโปรตีนที่ชัดเจนที่สุด 3 แถบคือ 23, 28 และ 153 กิโลดาลตัน โดยแถบโปรตีนขนาด 23 กิโลดาลตันเพิ่มขึ้น และพบแถบโปรตีนขนาด 153 กิโลดาลตันลดลง นอกจากนี้พบโปรตีนขนาด 28 กิโลดาลตันเพิ่มขึ้นเฉพาะกลุ่มที่พรางแสง 2 ชั้น (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 1 ความเข้มแสง 3 ระดับ (C = 52,500 ; T1 = 2,500 และ T2 = 800 ลักซ์) ที่มีผลต่อค่า (A) ปริมาณแอนโทไซยานิน (B) ค่าความเขียวใบ (C) ค่าการรั่วไหลของอิเล็กโทรไลต์ (D) ปริมาณสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ (E) ปริมาณโพรตีน (F) กิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส



ภาพที่ 2 แบบแผนโปรตีนของใบข้าวเหนียวดำที่มีอายุ 45 วัน ที่ได้รับความเข้มแสง 3 ระดับ (C = 52,500 ; T1 = 2,500 และ T2 = 800 ลักซ์) แยกโดยวิธี SDS-PAGE 12 เปอร์เซ็นต์ พอลิอะคริลาไมด์ ซ้อมแถบโปรตีนด้วยซิลเวอร์ไนเตรท

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ความเข้มแสงที่ลดลงจากการพร่างแสงมีผลทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินในใบข้าวเหนียวดำลดลง เช่นเดียวกับการศึกษาการพร่างแสงในผลองุ่น (Fujita et al., 2007) ใบมันเทศ (Islam et al., 2005) ใบถั่วฝักยาว (Nguyen and Cin, 2009) พืชเนย (Albert et al., 2009) เช่นเดียวกับค่าความเขียวของใบที่ใช้เครื่องคลอโรฟิลล์มิเตอร์วัดปริมาณคลอโรฟิลล์ทางอ้อม (Jangpromma et al., 2010) มีค่าลดลงเช่นกันแสดงให้เห็นว่าแอนโทไซยานินมีส่วนในการปกป้องคลอโรฟิลล์อันเนื่องมาจากสภาวะเครียดแสง ดังนั้นเมื่อแอนโทไซยานินมีค่าลดลงจึงส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ถูกทำลายและมีค่าลดลงด้วยเช่นกัน (Close and Beadle, 2003; Hada et al., 2003) จากการศึกษาปริมาณสารที่บ่งชี้ความเสียหายของเซลล์ในสภาวะเครียดพบว่า เมื่อความเข้มแสงลดลงปริมาณสารมาลอนไดอัลดีไฮด์และเปอร์ออกไซด์การั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์เพิ่มสูงขึ้นจากกลุ่มควบคุมอย่างเห็นได้ชัดซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์หลังจากได้รับสภาวะเครียดแสง เช่นเดียวกับการศึกษาในสภาวะเครียดแสง (นิสาชล และคณะ, 2555) และสภาวะเครียดจากความเค็ม (Akbari et al., 2013) จาก

การศึกษาการปรับตัวของข้าวเหนียวดำเพื่อลดความเสียหายของเซลล์เมื่ออยู่ในสภาวะเครียดแสงทางอ้อมโดยวัดปริมาณโปรตีนและเอนไซม์กำจัดอนุมูลอิสระ จากการวิจัยพบว่า เมื่อความเข้มแสงลดลงข้าวจะมีปริมาณโปรตีนสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เป็นไปได้ว่าความเข้มแสงต่ำจะกระตุ้นให้ปากใบเปิดน้อยหรือปิดลงเพื่อลดอัตราการคายน้ำ (สมบุญ, 2548) ดังนั้นพืชจะไม่สามารถลำเลียงน้ำไปเลี้ยงต้นพืชได้จึงอยู่ในสภาวะขาดน้ำจึงสะสมโพรรินมากขึ้น (วัฒนา, 2552) เปอร์ออกซิเดส เป็นเอนไซม์ที่พืชสร้างขึ้นมาเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ จากการทดลองพบว่า ในกลุ่มของข้าวที่พร่างแสง 2 ชั้น มีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูงกว่ากลุ่มควบคุมในขณะที่พร่างแสง 1 ชั้น มีปริมาณต่ำที่สุดแสดงว่าความเข้มแสงในระดับนี้มีความสามารถในการป้องกันอนุมูลอิสระที่เกิดจากความเครียดได้ดี เนื่องจากมีระบบกำจัดอนุมูลอิสระมีประสิทธิภาพทำให้เกิดความสมดุลของกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ ช่วยลดความรุนแรงที่เกิดจากสภาวะเครียด จึงทนต่อความเครียดแสงในระดับนี้ได้ดี จากการศึกษาเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนในใบข้าวเมื่ออยู่ในสภาวะเครียดแสงพบว่า ความเข้มแสงต่ำชักนำให้ข้าวมีการผลิตโปรตีนขนาด 23 กิโลดาลตันขึ้นมาแต่ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าข้าวมีกลไกผลิตขึ้นมาเพื่อทำหน้าที่อะไร มีรายงานว่าโปรตีนในช่วงขนาดนี้ คือ aquaporin ทำหน้าที่สำหรับการลำเลียงน้ำในพืช (Johanson et al., 2000) ซึ่งจะผลิตขึ้นมาเมื่อพืชอยู่ในสภาวะขาดน้ำ นอกจากนี้ กัลยา (2554) รายงานว่า พบโปรตีนขนาด 22-23 กิโลดาลตัน ในข้าวเหนียวดำมากกว่าข้าวเหนียวขาว โดยระบุว่าเป็น transcription factor protein ซึ่งมีหน้าที่เป็น transcription factor และอาจควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ด้วยแสง ขณะเดียวกันพบโปรตีนขนาด 28 กิโลดาลตัน ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่มีการพร่างแสง 2 ชั้น จากการศึกษาที่ผ่านมา มีรายงานว่า โปรตีนที่มีน้ำหนักประมาณ 28 กิโลดาลตัน คือกลุ่มของเอนไซม์แอสคอร์เบท เปอร์ออกซิเดส (ascorbate peroxidase) (Ishikawa et al., 1999; Sajitha Rajan and Muragan, 2010; Martell et al., 2012) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ

ซึ่งโปรตีนที่สร้างขึ้นมาสอดคล้องกับปริมาณแอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่วัดได้ในกลุ่มที่ได้รับแสงปกติและน้อยเกินไป

จากการศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า สภาวะเครียดจากความเข้มแสงต่ำส่งผลให้พืชมีปริมาณแอนโทไซยานินและคลอโรฟิลล์ลดลง ซึ่งสารสีเหล่านี้เป็นองค์ประกอบหลักในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช เมื่อปริมาณสารสีลดลงจึงมีผลทำให้อัตราการสังเคราะห์แสงลดลงพืชไม่สามารถสร้างอาหารได้เนื่องจากปริมาณแสงที่ส่องลงมาไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ทำให้เกิดสภาวะเครียดอันเนื่องมาจากแสง เมื่อเกิดสภาวะเครียดพืชจะสร้างสารอนุมูลอิสระขึ้นมาจำนวนมาก อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะไปออกซิไดซ์เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพเกิดการรั่วไหลของอิเล็กโตรไลต์ออกจากเซลล์เป็นจำนวนมาก อย่างไรก็ตามพืชจะมีกลไกการปรับตัวเพื่อลดความเสียหายของเซลล์เมื่ออยู่ในสภาวะเครียดแสงโดยการสะสมโปรตีนหรือผลิตแอนไซม์เพื่อกำจัดอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามการศึกษาแบบแผนโปรตีนยังไม่สามารถบอกได้ชัดเจนว่ามีการผลิตเพิ่มขึ้นมาเพื่ออะไร ดังนั้นจึงต้องส่งวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนและระบุหน้าที่ในลำดับต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากกลุ่มวิจัยข้าวทนเค็ม และกองทุนพัฒนาและส่งเสริมด้านวิชาการของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2557 ผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

กัลยา กองเงิน. 2554. รายงานการวิจัยเรื่องการบ่งชี้โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารประกอบแอนโทไซยานินในข้าวเหนียวดำ. ขอนแก่น: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

นิสาชล แจ่มพรมมา ประสิทธิ์ ใจคิด พชริน ส่งศรี ประสาร สวัสดิ์ชัยตั้ง ศักดา ดาดวง และ สมปอง ธรรมศิริรักษ์. 2555. การประเมินการรั่วไหลของสารอิเล็กโตรไลต์ และระดับมาลอนไดไฮดริสของใบอ้อย 10 สายพันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำ. เกษตร 40 ฉบับพิเศษ 3: 74-82.

บุษนา จันทร์ชารา. 2549. ผลของแสง เอทีฟอน และกรดแอบไซซิกต่อปริมาณแอนโทไซยานินและแอคติวิตีของฟีนอลอะลานีน แอมโมเนีย-ไลเอส ในเปลือกผลมะม่วงพันธุ์หมื่นหาชนระหว่างการเจริญของผล. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

วัฒนา พัฒนากุล. 2552. รายงานการวิจัยการศึกษาปัจจัยทางสรีรวิทยาที่มีผลต่อการสร้างและสะสมแอนโทไซยานินในข้าวเหนียวดำ. ขอนแก่น: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สมบุญ เตชะกัญญาวัฒน์. 2548. สรีรวิทยาของพืช. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Abdel-Aal, E.M. and Hucl, P. 1999. A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. Cereal Chemistry 76(3): 350-354.

Akbari, S., Kordi, S., Fatahi, S. and Ghanbari, F. 2013. Physiological responses of summer savory (*Satureja hortensis* L.) under salinity stress. International Journal of Agriculture and Crop Sciences 5(8): 838-844.

Albert, N.W., Lewis, D.H., Zhang, H., Irving, L.J., Paula, E., Jameson, P.E. and Davies, K.M. 2009. Light-induced vegetative anthocyanin pigmentation in *Petunia*. Journal of Experimental Botany 60: 2191-2202.

- Arakawa, O., Hori, Y. and Ogata, R. 1986. Characteristics of color development and relationship between anthocyanin synthesis and phenylalanine ammonia-lyase activity in Starking Delicious, Fuji and Mutsu apple fruits. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 54 : 424-430.
- Bates, L.S., Waldren, R.P. and Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39: 205-207.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Chance, B. and Maehly, A.C. 1995. Assay of catalase and peroxidases. *Methods Enzymology* 2: 764-775.
- Chutipaijit, S., Cha-um, S. and Sompornpailin, K. 2011. High contents of proline and anthocyanin increase protective response to salinity in *Oryza sativa* L. spp. Indica. *Australian Journal of Crop Science* 5(10): 1191-1198.
- Close, D.C. and Beadle, C.L. 2003. The ecophysiology of foliar anthocyanin. *Botanical Review* 69: 149-161.
- Critchley, C. 1981. Studies on the Mechanism of Photoinhibition in Higher Plants. *Plant Physiology* 67: 1161-1165.
- Dionisio-Sese, M.L. and Tobita, S. 1998. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science* 135: 1-9.
- Feng, F., Li, M., Ma, F. and Cheng, L. 2013. Phenylpropanoid metabolites and expression of key genes involved in anthocyanin biosynthesis in the shaded peel of apple fruit in response to sun exposure. *Plant Physiology and Biochemistry* 69: 54-61.
- Fujita, A., Soma, N., Goto-Yamamoto, N., Mizuno, A., Kiso, K. and Hashizume, K. 2007. Effect of shading on proanthocyanidin biosynthesis in the grape berry. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 76(2): 112-119.
- Gould, K.S. and Markhem, K.R. 2002. Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury. *Plant, Cell and Environment* 25: 1261-1269.
- Gregorio, G.B., Dharmawans, S. and Mendosa, R.D. 1997. Screening rice for salinity tolerance. *IRRI Discussion Paper Series No. 22* : 1-30.
- Gross, J. 1987. *Pigment in Fruits*. London: Academic Press INC. (London) LTD.
- Hada, H., Hidema, J., Maekawa, M. and Kumagai, T. 2003. Higher amounts of anthocyanins and UV-absorbing compounds effectively lowered CPD photo repair in purple rice (*Oryza sativa* L.). *Plant, Cell and Environment* 26: 1691-1701.
- Huner, N.P.A., Oquist, G. and Sarhan, F. 1998. Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends Plant Science* 3: 224-230.
- Ishikawa, T., Takeda, T. and Shigeoka, S. 1999. Purification and characterization cytosolic ascorbate peroxidase from komatsuna (*Brassica rapa*). *Plant Science* 120: 11-18.
- Islam, M.S., Jalaluddin, M. and Garner, J. O. 2005. Artificial shading and temperature influence on anthocyanin compositions in sweet potato leaves. *Horticultural Science* 40(1): 176-180.
- Jaakola, L. 2013. New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. *Trends in Plant Science* 18(9): 477-483.

- Jaakola, L., Hohtola, A., Karenlampi, S. and Maatta-Riihinen, K. 2004. Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. *Planta* 218: 721-728.
- Jangpromma, N., Songsri, P., Thammasirirak, S. and Jaisil, P. 2010. Rapid assessment of chlorophyll content in sugarcane using a SPAD chlorophyll meter across different water stress conditions. *Asian Journal of Plant Sciences* 9: 368-374.
- Johanson, I., Karlsson, M., Johanson, U., Larsson, C. and Kjellbom, P. 2000. The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 324-342.
- Jones, L.W. and Kok, B. 1966. Photoinhibition of chloroplast reactions. I. Kinetics and action spectra. *Plant Physiology* 41: 1037-1043.
- Martell, J.D., Deerinck, T.J., Sancak, Y., Poulos, T.L., Mootha, V.K., Sosinsky, G.E., Ellisman, M.H. and Ting, A.Y. 2012. Engineered ascorbate peroxidase as a genetically encoded reporter for electron microscopy. *Nature Biotechnology* 30(11): 1143-1148.
- Mol, J., Jenkins, G., Schafe, E. and Weiss, D. 1996. Signal perception, transduction, and gene expression involved in anthocyanin biosynthesis. *Critical Reviews in Plant Sciences* 15: 525-557.
- Nguyen, P. and Cin, V.D. 2009. The role of light on foliage colour development in coleus (*Solenostemon scutellarioides* (L.) Codd). *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 934-945.
- Sajitha Rajan, S. and Murugan, K. 2010. Purification and kinetic characterization of the liverwort *Pallavicinia lyelli* (Hook.) S. Gray. cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiology and Biochemistry* 48(9): 758-763.
- Singh, A., Selvi, M.T. and Sharma, R. 1999. Sunlight-induced anthocyanin pigmentation in maize vegetative tissue. *Journal of Experimental Botany* 50: 1619-1625.
- Stewart, R.R.C. and Bewley, J.D. 1980. Lipid peroxidation associated aging of soybean axes. *Plant Physiology* 65: 245-248.
- Steyn, W.J., Wand, S.J.E., Holcroft, D.M., and Jacobs, G. 2002. Anthocyanin in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist* 155: 349-361.
- Yoshida, S., Forno, D.A., Cock, J.H. and Gomez, K.A. 1976. Laboratory manual for physiological studies of rice. Los Banos: IRRI.