ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโต ปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ ปริมาณโพรลีน และกิจกรรมของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส ในถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merrill)

Effect of Sodium Chloride on Growth, Chlorophyll Contents, Proline Content and Superoxide Dismutase Activity in Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill)

จันทร์ธิรา ดวงจันทร์[1] ศิริพรรณ บรรหาร[1*]

Chanthira Duangchan[1] Siriphan Banharn[1*]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโต ปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ ปริมาณโพรลีนและกิจกรรมของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide Dismutase; SOD) ในถั่วเหลือง 2 พันธุ์ คือ สจ. 5 และ มข.35 ภายใต้สภาวะเค็ม โดยปลูกในสารละลายอาหารพืชสูตร Hoagland ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0, 40, 80 และ 120 มิลลิโมลาร์ และเก็บผลการทดลองที่ระยะเวลา 0, 4, 8, 12, 16 และ 24 วัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า ทุกระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ มีผลทำให้การเจริญเติบโตและปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบของถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์ มีแนวโน้มลดลงและน้อยกว่าชุดควบคุม โดยพันธุ์ สจ. 5 มีการเจริญเติบโตมากกว่าพันธุ์ มข. 35 และพันธุ์ สจ. 5 มีปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบมากกว่าพันธุ์ มข.35 สำหรับปริมาณโพรลีนและกิจกรรมของเอนไซม์ SOD ในใบของถั่วเหลือง ทั้ง 2 พันธุ์ พบว่า ถั่วเหลืองทั้งสองพันธุ์ที่ได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์ มีแนวโน้มของปริมาณโพรลีนและกิจกรรมของเอนไซม์ SOD ในใบเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพันธุ์ มข. 35 มีปริมาณโพรลีนและกิจกรรมของเอนไซม์ SOD ในใบมากกว่าพันธุ์ สจ. 5

คำสำคัญ : ถั่วเหลือง, โซเดียมคลอไรด์, โพรลีน, ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเตส

[1] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20130

*Corresponding author, E-mail : siripan@buu.ac.th

Abstract

This research aimed to study the effect of sodium chloride on growth, chlorophyll contents, proline content and superoxide dismutase activity in two soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivars i.e. SJ. 5 and KKU. 35 under salinity. Sodium chloride was added to the Hoagland nutrient solution at the concentrations of 0, 40, 80 and 120 mM and monitored these parameter at 0, 4, 8, 12, 16 and 24 days. At the end of the experimental period, growth of two soybean cultivars under higher salt concentrations significantly decreased when compared to the control. The growth of SJ.5 cultivars was higher than KKU. 35 cultivars. Effect of salt on leaf chlorophyll contents of two cultivars under all concentrations of sodium chloride tended to decrease and leaf chlorophyll contents of SJ.5 was higher than KKU. 35. For proline content and activity of SOD in two cultivars under all concentrations of sodium chloride tended to increase significantly when compared to the control. On the other hands, KKU. 35 tended to accumulate more proline and increased SOD enzyme activity than SJ.5.

Keywords: Soybean, Sodium Chloride, Proline, Superoxige Dismutase

1. บทนำ

ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merrill) เป็นพืชวงศ์ถั่วที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของโลกและของประเทศไทย ถั่วเหลืองสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย ทั้งคนและสัตว์เลี้ยงใช้บริโภคเป็นอาหาร รวมทั้งใช้บริโภคในรูปผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น น้ำนมถั่วเหลือง เต้าหู้ เต้าเจี้ยว ซีอิ๊ว เป็นต้น ส่วนกากถั่วเหลืองใช้เลี้ยงสัตว์ ประกอบกับสามารถใช้เป็นพืชบำรุงดินได้ดี ในประเทศไทยมีความต้องการใช้ถั่วเหลืองสูงกว่าผลผลิตที่มีในประเทศ จึงต้องนำเข้าจากต่างประเทศ รวมทั้งการลดลงของพื้นที่เพาะปลูก เนื่องจากบางพื้นที่เพาะปลูกมีสภาพเป็นดินเค็มหรือแห้งแล้ง หรือการขาดแคลนเมล็ดพันธุ์ที่ดี ราคาพืชแข่งขันที่ดีกว่า และปัญหาการขาดแคลนแรงงานในการเก็บเกี่ยว (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2557)

โดยปกติ ในสภาพดินเค็มเกลือที่พบ ส่วนใหญ่ได้แก่ เกลือโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งเป็นพิษต่อพืช ดินที่มีเกลือชนิดนี้จัดว่าเป็นดินที่มีปัญหาต่อการปลูกพืช เนื่องจากความเข้มข้นของเกลือที่มีมากในดินมีผลทำให้รากพืชดูดน้ำได้น้อยลง พืชจึงประสบกับภาวะขาดน้ำ ส่งผลไปยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช (Takemura, Hanagata, Sugihara, Baba, Karube & Dubinsky, 2000) โดยมีผลทำให้น้ำหนักแห้งของราก ลำต้น และใบ ลดลง (Henandez, Jimenez, Mullineaux & Sevilla,

2000) ซึ่งการสะสมเกลือในปริมาณมากเกินไป พืชจะแสดงอาการผิดปกติ เช่น ลำต้นแคระแกร็น ใบเหี่ยว ใบแห้งตายเป็นจุด ๆ หรือขอบใบไหม้ เป็นต้น (Whiting, Card & Wilson, 2010) นอกจากนี้ ความเครียดที่เกิดจากความเค็มที่พืชได้รับทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบพืชลดลง โดยใบจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แห้งและตาย หากได้รับความเครียดเป็นเวลานาน สามารถใช้ปริมาณคลอโรฟิลล์เป็นตัวบ่งชี้สำหรับระดับความทนเค็มของพืชบางชนิดได้ (ปิยะดา ธีระกุลพิศุทธิ์, 2559) พืชที่เจริญเติบโตอยู่ในภาวะดินเค็มจึงต้องมีการปรับตัวเพื่อให้อยู่รอดได้ วิธีการปรับตัวอย่างหนึ่งของพืช คือ การสะสมกรดอะมิโนไว้ในเซลล์ ของพืช กรดอะมิโนที่พบว่าพืชมีการสะสมในปริมาณมากเมื่ออยู่ในภาวะเค็ม คือ โพรลีน ซึ่งทำหน้าที่ช่วยในการปรับแรงดันออสโมติกภาย ในเซลล์พืชให้ลดต่ำลงเพื่อพืชจะดูดน้ำมาใช้ได้มากขึ้น (Smirnoff, 1993)

นอกจากนี้สภาวะความเครียดยังส่งผลให้พืชเกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระ (Reactive Oxygen Species ; ROS) สูงขึ้น ซึ่งส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (Superoxide Dismutase : SOD) ซึ่ง SOD เป็นเอนไซม์ตัวแรกที่มากำจัด ROS ภายใต้สภาวะความเครียดโดย SOD จะไปเปลี่ยน ROS ไปเป็น Hydrogen Peroxide (H_2O_2) (Foyer, Descourvieres & Kurnert, 1994) และจะมี Catalase (CAT) มาทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน H_2O_2 ให้เป็น H_2O และ O_2 ต่อไป (Feierabend, 2005)

ในการศึกษาครั้งนี้ มีความสนใจที่จะศึกษาถึงผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโต ปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ ปริมาณโพรลีนและกิจกรรมของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส ซึ่งใช้ถั่วเหลือง 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ สจ.5 และพันธุ์ มข. 35 ซึ่งถั่วเหลืองทั้งสองพันธุ์นี้สามารถปลูกได้ทั่วไปในแหล่งปลูกถั่วเหลืองของประเทศไทยรวมถึงภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งมีการแพร่กระจายของดินเค็ม โดยถั่วเหลืองจัดเป็นพืชที่ทนเค็มในระดับปานกลาง (วีระศักดิ์ เทพจันทร์ และ สิทธิ์ แดงประดับ, 2547) ซึ่งในการทดลองนี้จำลองการปลูกถั่วเหลืองในระบบไฮโดรโพนิกส์และให้โซเดียมคลอไรด์ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ซึ่งในปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับพันธุ์ถั่วเหลืองไทยที่มีความทนเค็มยังมีน้อย โดยการทดลองครั้งนี้ได้ทำการศึกษาในถั่วเหลืองสองพันธุ์ที่ได้รับความเครียดจากโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้ สามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองที่ปลูกในสภาวะเค็มให้มีผลผลิตที่สูงขึ้นได้

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโต ปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ ปริมาณโพรลีนและกิจกรรมของเอนไซม์ SOD ของถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 5 และ มข. 35

3. อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

3.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำประกอบด้วย 2 ปัจจัย ปัจจัยที่ 1 ใช้ถั่วเหลือง 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ สจ.5 และ พันธุ์ มข. 35 ปัจจัยที่ 2 ให้เกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0, 40, 80 และ 120 มิลลิโมลาร์ในสารละลายธาตุอาหารพืชตามลำดับ โดยในการเก็บข้อมูลแต่ละครั้งใช้การเก็บแบบสุ่มต้นถั่วเหลืองมา 3 ต้นในแต่ละซ้ำ

3.2 การวิเคราะห์การเจริญเติบโต

วิเคราะห์น้ำหนักแห้ง โดยการสุ่มตัวอย่างแต่ละชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ต้น ซึ่งจะเก็บข้อมูลน้ำหนักแห้งแยกส่วนออกเป็น ราก ลำต้น และใบ นำตัวอย่างแต่ละส่วนมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักแห้งแต่ละส่วนด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น GD603) บันทึกผล

3.3 การศึกษาการตอบสนองทางสรีรวิทยา

3.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์รวมในใบ

วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์รวมในใบ โดยเก็บตัวอย่าง 2 ตำแหน่งใบ คือ ตำแหน่งข้อที่ 2 นับจากยอด เป็นตัวแทนใบอ่อนและตำแหน่งข้อที่ 1 นับจากโคนเป็นตัวแทนใบแก่ โดยสกัดใบสดถั่วเหลืองด้วย Acetone 80% ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก อัญชลี ร่มพา (2543) เจาะใบถั่วเหลืองด้วยที่เจาะกระดาษเป็นชิ้นเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร จำนวน 5 ชิ้น แช่ชิ้นส่วนใบใน Acetone 80% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองปิดสนิท เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 663.2 และ 646.8 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (ยี่ห้อ Shimadzu, U.S.A.) นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์รวมจากสมการของ Lichtenthaler (1987) ดังนี้

$$total\ Chl = 7.15A_{663.2} + 18.71A_{646.8}$$

3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณโพรลีน

วิเคราะห์ปริมาณโพรลีนโดยเก็บตัวอย่างใบถั่วเหลืองในตำแหน่งใบที่ 3 นับจากยอด และตำแหน่งใบที่ 5 นับจากยอด ดัดแปลงตามวิธีของ Bates, Woldren & Teare (1973) โดยชั่งตัวอย่างพืชสดประมาณ 0.25 กรัม บดกับ 3% Sulfosalicylic Acid ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นนำสารละลายที่กรองได้ 1 มิลลิลิตร เติม Acid-Ninhydrin ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ Glacial Acetic acid ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและสิ้นสุดปฏิกิริยาที่อ่างน้ำแข็ง 0 องศาเซลเซียส

นาน 10 นาที จากนั้นนำ Reaction Mixture ที่ได้เติม Toluene ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าประมาณ 15-20 วินาที สารละลายจะเกิดการแยกตัวออกจากกัน จากนั้นดูดสารละลายส่วนบนและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (ยี่ห้อ Shimadzu, U.S.A.)

3.3.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ SOD

ดัดแปลงตามวิธีการของ Sunohara & Matsumoto (2004) มีขั้นตอนดังนี้

1) การสกัดเอนไซม์ ทำการสกัดเอนไซม์ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยนำตัวอย่างใบถั่วเหลืองที่หั่นละเอียดหนัก 1 กรัม ใส่ในโกร่งบดแช่เย็นที่มีไนโตรเจนเหลว แล้วเติมสารละลายสกัด (Extraction Solution) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย 25 mM Potassium Phosphate Buffer (pH 7.8), 0.4 mM Ethylenediamine-tetraacetic Acid (EDTA), 1 mM Ascorbic Acid และ 2% Polyvinyl Polypyrrolidone (PVPP) เมื่อบดเข้ากันดีแล้ว นำไปเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 15,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำส่วนของเหลวใส (Supernatant) มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 นำส่วนของเหลวใสที่ผ่านการกรองซึ่งเป็น Crude Enzyme ใช้ในขั้นตอนการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ SOD ต่อไป

2) การวิเคราะห์โปรตีน โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Lowry, Rosebrough, Far & Randall (1951) คือ นำ Crude Enzyme ที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยเติม Crude Enzyme (จากข้อ 1) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบที่มีสาร Alkaline Copper Solution ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร (สาร ละลายนี้ประกอบด้วย 4% Na_2CO_3 : 0.2 N NaOH : 1% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$: 2% Potassium Tartrate ในอัตราส่วน 5 : 5 : 0.1 : 0.1) ผสมให้เข้ากันวางไว้นาน 15 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 50% Folin Ciocalteu Phenol Reagent ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร วางไว้เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายผสมวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (ยี่ห้อ Shimadzu, U.S.A.) แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Bovine Serum Albumin (BSA) ซึ่งปริมาณโปรตีนที่ได้มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อ 1 กรัมน้ำหนักสด (mg/g Fresh Weight) โดยใช้สูตรคำนวณของ Lowry et al. (1951) ดังนี้

ปริมาณโปรตีน (mg/g fresh weight) = 50Y

เมื่อ Y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

3) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์SOD โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณ SOD จากตัวอย่างที่สกัด เติม Reaction Mixture ที่ประกอบด้วย Phosphate Buffer (pH 7.8) 50 มิลลิโมลาร์ Methionine 13 มิลลิโมลาร์ Nitro Blue Tertrazolium (NBT) 75 ไมโครโมลาร์ Riboflavin 2 ไมโครโมลาร์และ EDTA 0.1 มิลลิโมลาร์ เริ่มปฏิกิริยา

ด้วยการนำไปส่องด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ 15 วัตต์ เป็นเวลา 10 นาที และหยุดปฏิกิริยาจากนั้นนำสารละลายสีน้ำเงินที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (ยี่ห้อ Shimadzu, U.S.A.) และคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ SOD มีหน่วยเป็น unit/mg protein

3.4 วิธีการประเมินผล/ สังเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบปัจจัยเดียว (One-Way Analysis of Variance) และทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของพารามิเตอร์ต่างๆ โดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

4. ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

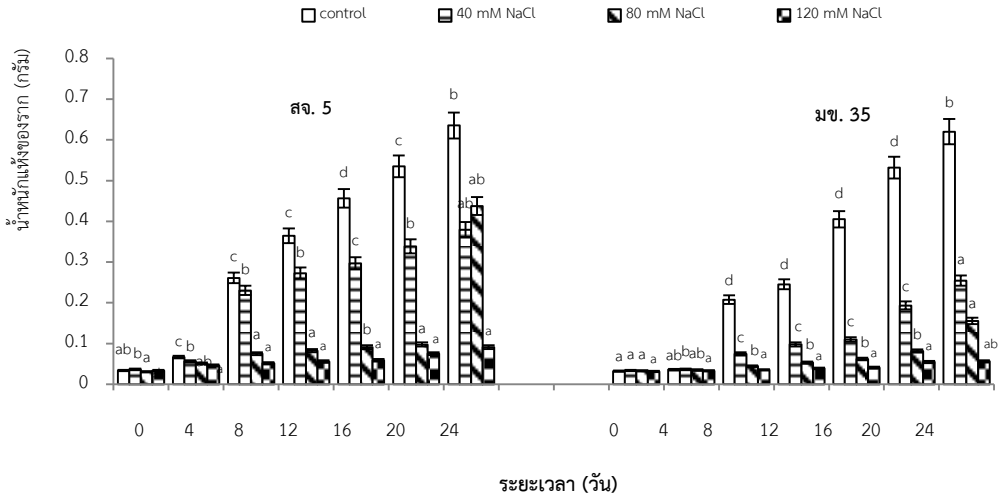
4.1 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการตอบสนองด้านการเจริญเติบโต

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า การให้โซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 40, 80 และ 120 มิลลิโมลาร์ มีผลต่อการตอบสนองด้านการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองคือ น้ำหนักแห้งของราก ลำต้น และใบของถั่วเหลืองทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยมีแนวโน้มลดลงและน้อยกว่าชุดควบคุม ซึ่งที่ระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในระดับเดียวกันนั้น ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 5 มี น้ำหนักแห้งของราก ลำต้น และใบ มากกว่าถั่วเหลืองพันธุ์ มข. 35 แสดงให้เห็นว่า ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 5 มีการเจริญเติบโตภายใต้สภาวะที่ได้รับเกลือดีกว่าถั่วเหลืองพันธุ์ มข. 35 (ภาพที่ 1,2 และ 3)

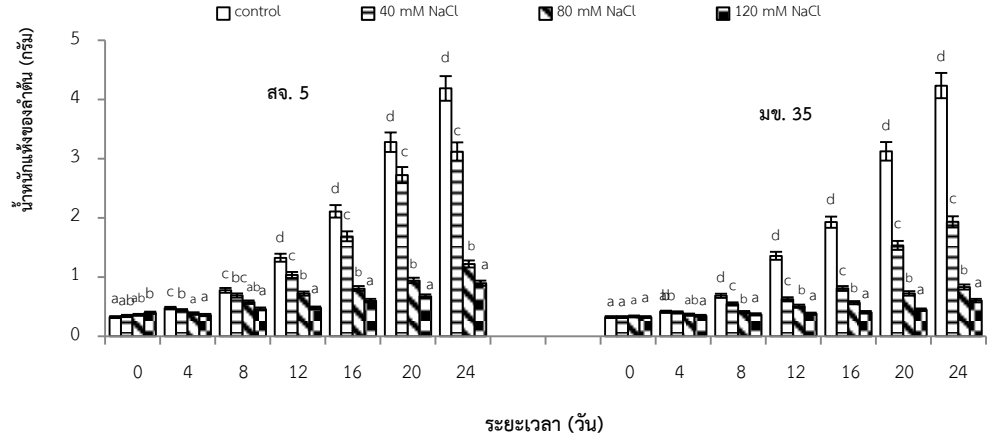
การที่ต้นพืชเจริญเติบโตอยู่ภายใต้ภาวะที่ได้รับเกลือในสารละลายธาตุอาหารพืช ส่งผลให้สารละลายมีค่าศักย์ของน้ำ (Water Potential) ต่ำ ทำให้พืชดูดน้ำได้ยากขึ้น หรือเสียน้ำออกจากต้น หากค่าศักย์ของน้ำในต้นต่ำกว่าค่าศักย์ของน้ำในสารละลายจะเกิดผลกระทบทางด้านออสโมซีส ทำให้เกิดสภาวะความเครียดออสโมติก ซึ่งมีผลทำให้การขยายขนาดของเซลล์ลดลงในเนื้อเยื่อที่กำลังเจริญ และการเจริญเติบโตของพืชลดลง (Munns, 2002) สอดคล้องกับรายงานของ Hernandez et al. (2000) ที่ได้กล่าวว่าโซเดียมคลอไรด์ในสารละลายมีผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืช โดยไปยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช ทำให้น้ำหนักแห้งของราก ลำต้น และใบลดลงเนื่องจากความเครียดออสโมติก ทำให้น้ำมีแรงดันออสโมติกเพิ่มขึ้นและความต่างศักย์ของน้ำลดลง โดยน้ำจะไหลจากบริเวณที่มีค่าศักย์ของน้ำสูงไปยังบริเวณที่มีความค่าศักย์ของน้ำต่ำกว่า ทำให้น้ำไหลออกจากเซลล์พืช ปริมาณของน้ำในสารละลายจะลดลง ทำให้พืชไม่สามารถดูดน้ำจากสารละลายได้ จึงทำให้มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืช (วิชิตพล มีแก้ว, ณัฐพล ขันธปราบ และ สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ, 2553)

นอกจากนี้ พบว่า ใบของถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์ที่ได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์ มีลักษณะใบ

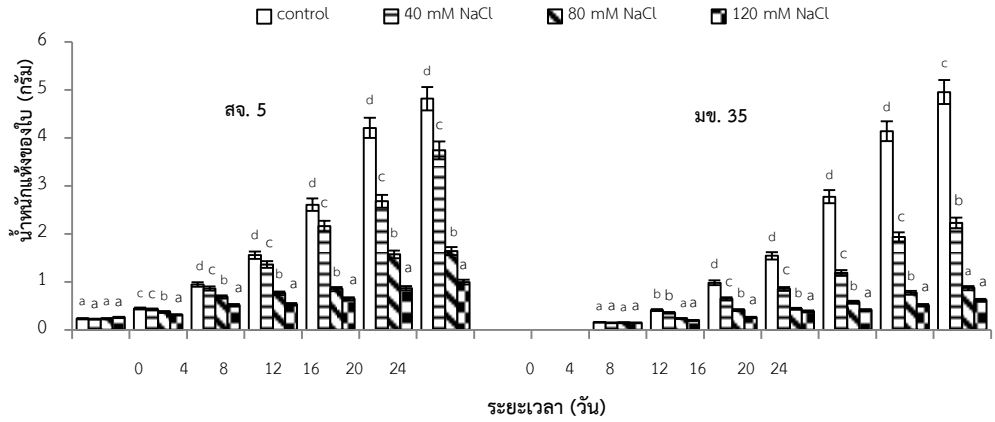
เหี่ยว เนื่องจากเกลือที่ได้รับจะไปส่งเสริมการเสื่อมสภาพของใบ (Senescence) การลำเลียงเกลือผ่านใบที่กำลังคายน้ำอย่างต่อเนื่องจะส่งผลให้ความเข้มข้นของโซเดียมและคลอไรด์สูงขึ้นมากและในที่สุดจะทำให้ใบเหล่านั้นตาย (นวรัตน์ อุดมประเสริฐ, 2558)



ภาพที่ 1 น้ำหนักแห้งของรากของถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 5 และ มข. 35 ที่ได้รับ NaCl ในระดับความเข้มข้นแตกต่างกันตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น (Bars แทนค่าความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน)



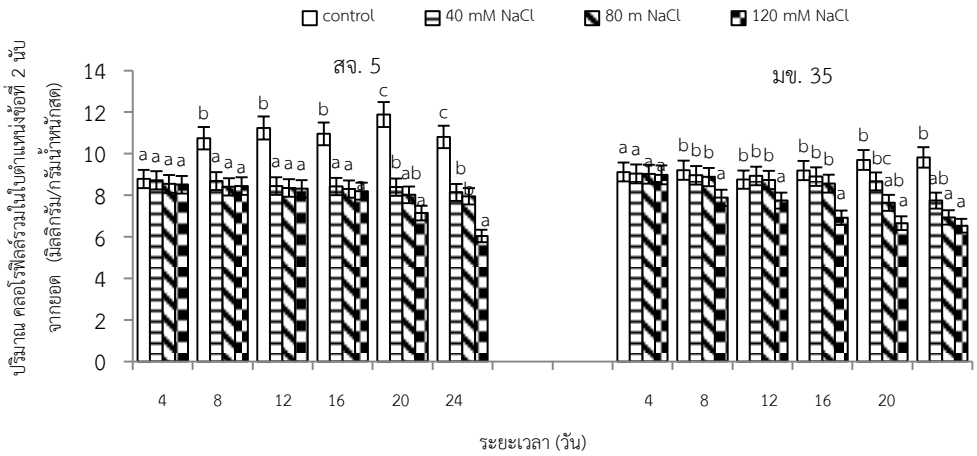
ภาพที่ 2 น้ำหนักแห้งของลำต้นของถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 5 และ มข. 35 ที่ได้รับ NaCl ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น (Bars แทนค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน)



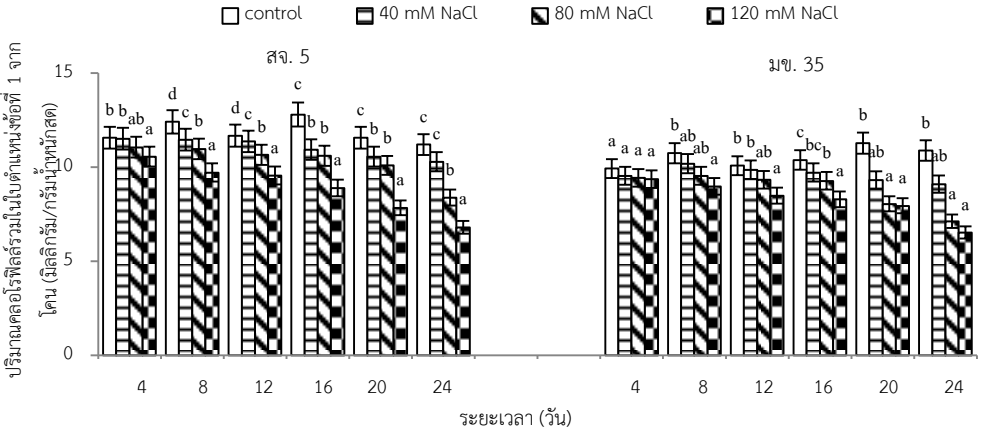
ภาพที่ 3 น้ำหนักแห้งของใบของถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 5 และ มข. 35 ที่ได้รับ NaCl ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น (Bars แทนค่าความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน)

4.2 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อปริมาณคลอโรฟิลล์รวมในใบ

จากการทดลอง พบว่า ปริมาณคลอโรฟิลล์รวมในใบตำแหน่งข้อที่ 2 นับจากยอด และใบในตำแหน่งข้อที่ 1 นับจากโคนของถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์ ที่ได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นในทุกระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์นั้น มีแนวโน้มลดลงจากชุดควบคุม และเมื่อพิจารณาที่ระดับความเข้มของโซเดียมคลอไรด์เดียวกัน ในถั่วเหลืองทั้งสองพันธุ์เมื่อสิ้นสุดการทดลองจะเห็นได้ว่า ปริมาณคลอโรฟิลล์รวมในใบตำแหน่งข้อที่ 1 จากโคนสูงกว่าในใบตำแหน่งข้อที่ 2 จากยอด และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์จะเห็นว่า ปริมาณคลอโรฟิลล์รวมในใบถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 5 มีค่าสูงกว่าถั่วเหลืองพันธุ์ มข. 35 (ภาพที่ 4 และ 5) นอกจากนี้จะเห็นได้ว่า ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือที่สูงขึ้น ปริมาณคลอโรฟิลล์รวมในใบของถั่วเหลืองทั้งสองพันธุ์มีค่าลดลง ซึ่งปริมาณคลอโรฟิลล์รวมในใบที่ลดลงนี้เนื่องจากผลของความเครียดจากเกลือ โดยมีสาเหตุมาจากการยับยั้งการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์หรือการเร่งการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ (ปิยะดา ธีระกุลพิศุทธิ์, 2559) โดยสภาวะเครียดจากโซเดียมคลอไรด์มีผลทำให้กรดอัลฟาไลโปอิค (Alpha Lipoic Acid : ALA) ในใบพืชลดลงซึ่ง ALA เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการสร้างคลอโรฟิลล์ ดังนั้น การลดลงของสารนี้จึงทำให้คลอโรฟิลล์ในใบพืชลดลง และโซเดียมคลอไรด์ยังมีผลไปเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์คลอโรฟิล-เลส (Chlorophyllase) ซึ่งถือเป็นเอนไซม์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการเร่งการสลายคลอโรฟิลล์ (Conceicao, 2004) จึงส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์รวมในใบของถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์ ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม



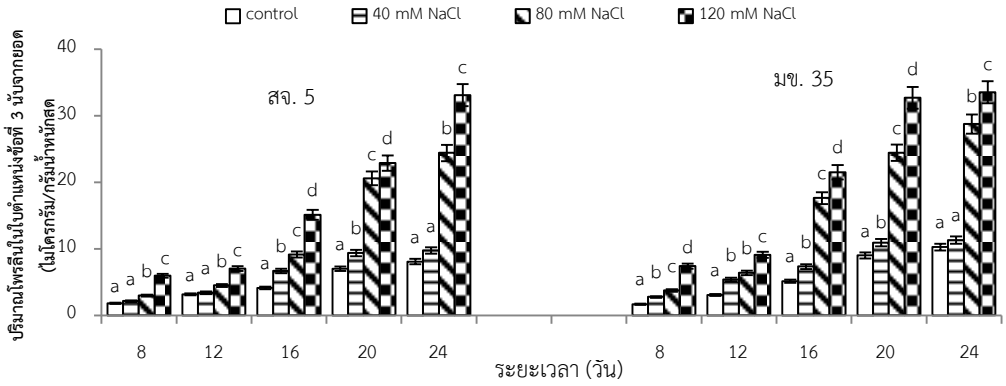
ภาพที่ 4 ปริมาณคลอโรฟิลล์รวมในใบตำแหน่งข้อที่ 2 นับจากยอด ของถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 5 และ มข. 35 ที่ได้รับ NaCl ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น (Bars แทนค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน)



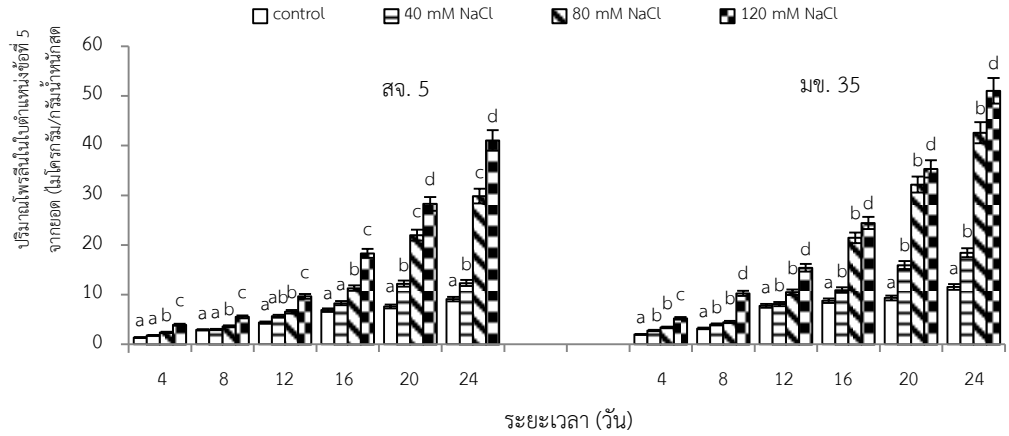
ภาพที่ 5 ปริมาณคลอโรฟิลล์รวมในใบตำแหน่งข้อที่ 1 นับจากโคนของถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 5 และ มข. 35 ที่ได้รับ NaCl ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น (Bars แทนค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน)

4.3 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อปริมาณโพรลีน

จากการทดลองพบว่า ปริมาณโพรลีนในใบตำแหน่งข้อที่ 3 นับจากยอด และปริมาณโพรลีนในใบตำแหน่งข้อที่ 5 นับจากยอด ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างกันตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น พบว่า ปริมาณโพรลีนในตัวอย่างใบที่ได้จากตำแหน่งใบทั้งสองตำแหน่งของถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม และที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เดียวกัน ปริมาณโพรลีนทั้งสองตำแหน่งใบของถั่วเหลืองพันธุ์ มข. 35 มีค่ามากกว่าถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 5 (ภาพที่ 6 และ 7)



ภาพที่ 6 ปริมาณโพรลีนในใบตำแหน่งข้อที่ 3 นับจากยอดของถั่ว เหลืองพันธุ์ สจ.5 และมข. 35 ที่ได้รับ NaCl ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น (Bars แทนค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน)



ภาพที่ 7 ปริมาณโพรลีน ในใบตำแหน่งข้อที่ 5 จากยอดของถั่วเหลือง พันธุ์ สจ. 5 และมข. 35 ที่ได้รับ NaCl ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น (Bars แทนค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน)

โซเดียมคลอไรด์ที่ถั่วเหลืองได้รับส่งผลให้ถั่วเหลืองอยู่ในสภาพเครียดซึ่งในสภาพนี้พืชจะสร้างโพรลีนมากขึ้น เนื่องจากโพรลีนช่วยเพิ่มความทนต่อสภาพเครียด นั่นคือ โพรลีนที่สะสมสูงขึ้นภายในเซลล์จะช่วยปรับลดค่าศักย์ออสโมติกของเซลล์ให้ต่ำกว่าศักย์ของน้ำนอกเซลล์ ช่วยให้พืชดูดน้ำได้ดีขึ้น และโพรลีนเป็นสารต้านออกซิเดชัน ช่วยกำจัดอนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจน โดยทำปฏิกิริยาโดยตรงกับอนุมูลอิสระ ทำให้ปริมาณสารอนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจนลดต่ำลง กระบวนการทำลายลิพิดจึงลดลง ทำให้ช่วยรักษาสภาพของเมมเบรนได้ รวมทั้งการสังเคราะห์โพรลีนจากกลูตาเมตช่วยรักษาสมดุลปริมาณ NADPH/$NADP^+$ในคลอโรพลาสต์ให้

เหมาะสม ป้องกันไม่ให้เกิดความเสียหายแก่คลอโรพลาสต์ ช่วยให้พืชสามารถอยู่รอดได้ในภาวะเครียด (Rejeb, Abdelly & Savoure, 2014)

ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Mozafar, Mahlagha & Hassan (2007) ที่ได้ศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองโดยทดลองที่ระดับความเข้มข้น 0, 50, 100, 150 และ 200 mM NaCl พบว่า ถั่วเหลืองกลุ่มที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์จะมีการสะสมโพรลีนในปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่สูงขึ้น

ถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์ ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ทุกระดับความเข้มข้น มีปริมาณโพรลีนในใบตำแหน่งที่ 5 นับจากยอด สูงกว่าใบที่ 3 นับจากยอด สอดคล้องกับการศึกษาของ Zhang, L. and Becker, D. F (2015) พบว่า ปริมาณของโพรลีนที่สะสมในใบขึ้นอยู่กับอายุของใบพืช เนื่องจากเมื่อพืชได้รับความเค็ม ใบแก่จะมีปริมาณเกลือมากกว่าใบอ่อน ส่งผลให้ใบแก่มีการสร้างโพรลีนมากกว่าใบอ่อนเพื่อป้องกันความเสียหายให้แก่เมมเบรนของใบซึ่งช่วยให้พืชอยู่รอดได้

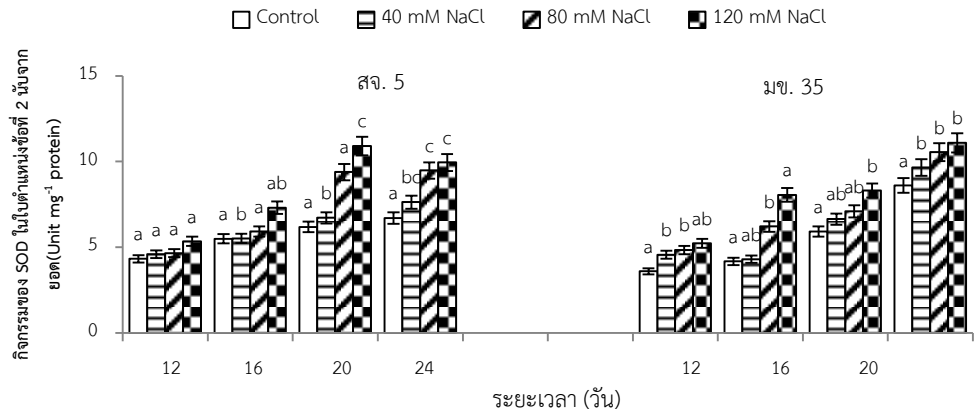
4.4 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ SOD

จากการทดลองพบว่า กิจกรรมของ SOD ในใบตำแหน่งข้อที่ 2 นับจากยอด และกิจกรรมของ SOD ในใบตำแหน่งข้อที่ 1 นับจากโคน ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ต่างกัน พบว่า ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของ SOD ในทั้งสองตำแหน่งใบของถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม และที่ระดับความเข้มของโซเดียมคลอไรด์เดียวกัน จะเห็นได้ว่า ถั่วเหลืองพันธุ์ มข. 35 มีกิจกรรมของ SOD ที่มากกว่าถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 5 (ภาพที่ 8 และ 9)

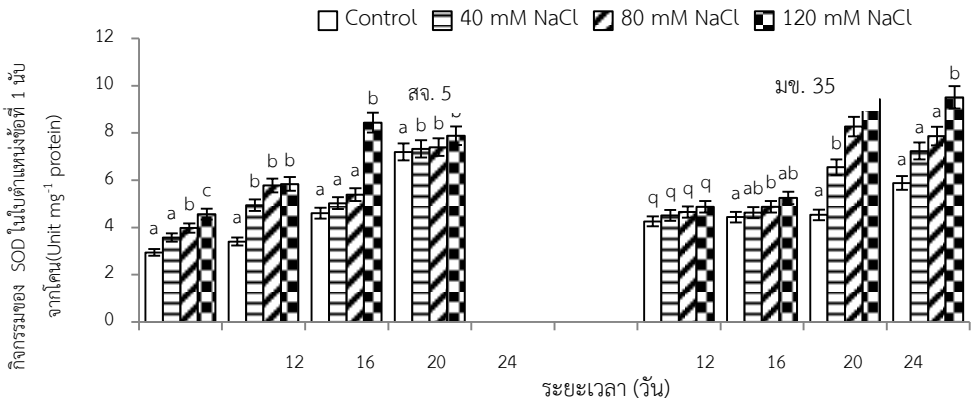
การที่พืชได้รับโซเดียมคลอไรด์ทำให้พืชอยู่ในสภาวะความเครียดออสโมติก ส่งผลให้เกิดการสร้าง Reactive Oxygen Species (ROS) สูงขึ้น นำไปสู่การเกิดลิปิดเพอร์ออกซิเดชั่น (Lipid Peroxidation) และการทำลายองค์ประกอบต่าง ๆ ในเซลล์ ซึ่ง SOD เป็นเอนไซม์ตัวแรกที่กำจัดพวก ROS ภายใต้สภาวะเครียด โดย SOD สามารถเปลี่ยน Superoxide Radical ไปเป็นไฮโดรเจน เพอร์ออกไซด์ (Hydrogen Superoxide : H_2O_2) และออกซิเจน (Attia, Karray & Lachaâl, 2009) เมื่อเปรียบเทียบตำแหน่งใบ พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ SOD ในใบตำแหน่งข้อที่ 1 นับจากโคน สูงกว่าในใบตำแหน่งข้อที่ 2 นับจากยอด ในทุกระดับความเข้มข้น เป็นไปได้ในใบตำแหน่งข้อที่ 1 นับจากโคน มีการสะสมโซเดียมคลอไรด์ ในระดับความเข้มข้นที่สูงกว่าและเกิด ROS ขึ้นมากกว่าใบตำแหน่งข้อที่ 2 นับจากยอด จึงมีกิจกรรมของเอนไซม์ SOD สูงกว่า เพื่อควบคุมปริมาณ ROS ไม่ให้สร้างความเสียหายแก่เซลล์ (Yordanova, 2004)

ผลการทดลองครั้งนี้มีความสอดคล้องกับรายงานของ Ramana, Padhy & Chaitanya (2012) ที่ได้ศึกษาการตอบสนองของถั่วเหลือง 4

สายพันธุ์ (MAU-61, LSB-1, NRC-37 and MA CS-57) ภายใต้สภาวะเค็ม โดย ได้รับโซเดียมคลอไรด์ที่แตกต่างกัน (100, 200 และ 300 mM) เป็นเวลา 30 วัน พบว่า ถั่วเหลืองทั้ง 4 สายพันธุ์ มีแนวโน้มในการสะสม SOD เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงขึ้น เช่นเดียวกับการศึกษาของ Chaitanya, Spandana, Srinivas & Kumar (2009) ที่ได้ศึกษาการตอบสนองของสารต้านอนุมูลอิสระ ของถั่วเหลืองภายใต้สภาวะเค็ม โดยศึกษาในถั่วเหลือง 2 สายพันธุ์ (Lsb 1 และ PK 471) โดยได้รับโซเดียมคลอไรด์ (100, 200 และ 300 mM) เป็นเวลา 15 วัน พบว่า ถั่วเหลืองอยู่ในสภาวะเครียด ส่งผลให้กิจกรรมของ SOD ในถั่วเหลืองเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น และถั่วเหลืองพันธุ์ Lsb 1 มีคุณสมบัติความทนทานต่อความเครียดจากโซเดียมคลอไรด์มากกว่าถั่วเหลืองพันธุ์ PK 471



ภาพที่ 8 กิจกรรมของ SOD ในใบตำแหน่งข้อที่ 2 นับจากของของถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 5 และ มข. 35 ที่ได้รับ ในระดับความเข้มข้น ที่แตกต่างกันตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น (Bars แทนค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน)



ภาพที่ 9 กิจกรรมของ SOD ในใบตำแหน่งข้อที่ 1 นับจากโคนของถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 5 และ มข.35 ที่ได้รับ NaCl ในระดับ ความเข้มข้นที่แตกต่างกันตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น (Bars แทนค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน)

5. สรุปผลการศึกษา

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า เกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 40, 80 และ 120 มิลลิโมลาร์ มีผลทำให้น้ำหนักแห้งของราก ลำต้น และใบ ถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์ มีค่าลดลง โดยถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 5 ที่เจริญเติบโตภายใต้ภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์นั้น มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าถั่วเหลืองพันธุ์ มข. 35 นอกจากนั้น โซเดียมคลอไรด์ยังมีผลทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์รวมในใบของถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์ลดลง โดยปริมาณคลอโรฟิลล์รวมในใบตำแหน่งที่ 1 นับจากโคนสูงกว่าในใบตำแหน่งที่ 2 นับจากยอด และจะเห็นได้ว่าถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 5 มีปริมาณคลอโรฟิลล์รวมในใบ ในทั้งสองตำแหน่งใบสูงกว่าถั่วเหลืองพันธุ์ มข. 35

นอกจากนี้ โซเดียมคลอไรด์ยังมีผลทำให้ปริมาณโพรลีนในใบของถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์เพิ่มสูงขึ้น โดยปริมาณโพรลีนในใบตำแหน่งที่ 5 นับจากยอด สูงกว่าในใบตำแหน่งที่ 3 นับจากยอด และปริมาณของโพรลีนในใบของถั่วเหลืองพันธุ์ มข. 35 มากกว่าถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 5 รวมถึงโซเดียมคลอไรด์มีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ SOD ในถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์ เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งโซเดียมคลอไรด์มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ SOD ในใบของถั่วเหลืองพันธุ์ มข. 35 มากกว่าถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 5 เมื่อพิจารณาจากผลการทดลองสามารถเสนอแนะได้ว่า ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 5 มีความสามารถทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้ดีกว่าถั่วเหลืองพันธุ์ มข. 35

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง ที่ให้ความรู้และให้ความอนุเคราะห์ เครื่องมือในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ SOD

เอกสารอ้างอิง

นวรัตน์ อุดมประเสริฐ. (2558). *สรีรวิทยาของพืชในสภาวะเครียด.* กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปิยะดา ธีระกุลพิศุทธิ์. (2559). *สรีรวิทยาของพืชในสภาพเค็ม.* ขอนแก่น: ขอนแก่นการพิมพ์.

วิชิตพล มีแก้ว, ณัฐพล ขันธปราบ และ สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ. (2553). การปรับตัวของพืชทนเค็มภายใต้สภาวะที่มีความเค็ม. *ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์, 10*(2), 28-37.

วิระศักดิ์ เทพจันทร์ และ สิทธิ์ แดงประดับ. (2547). *ถั่วเหลือง.*กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร สถาบันวิจัยพืชไร่

สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. (2557). *สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม ปี 2558*. กรุงเทพฯ : สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

อัญชลี ร่มพา. (2543). *ความสัมพันธ์ของแอกติวิตีของซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเตส ปริมาณรงควัตถุในการสังเคราะห์ด้วยแสงและการ*

เจริญเติบโตในถั่วเหลือง Glycine max (L.) Merrill ภายใต้ภาวะเค็ม. ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ

Attia, H. Karray, N. & Lachaâl, M. (2009). Light interacts with salt stress in regulating superoxide dismutase gene expression in Arabidopsis. *Plant Sci., 177*:161-167.

Aziz A. & Larher F. (1998). Osmotic stress induced changes in lipid composition and peroxidation in leaf discs of Brassica napus *L. J. Plant Physiol., 153*, 754-762

Bates, L.S, Woldren, R.P. & Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline foe water stress studies. *Plant and Soil., 39*, 31-37.

Chaitanya, K.V. Spandana, M.S. Srinivas, D. & Kumar, A.L. (2009). Antioxidative responses of soybean (Glycine max. L) seedlings to salinity stress. *J. Plant Biol., 36*, 83-87.

Feierabend, N. (2005). Catalases in Plants: Molecular and Functional Properties and Role in Stress Defence. *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*., 101–140.

Foyer, C.H., Descourvieres, P. & Kurnert, K.J. (1994). Protection against oxygen radicals : an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Envi., 17*, 507-523.

Conceicao, V.S. (2004). Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress insunflower leaves. *Journal of Scientia Horticulturae. 103*, 93-99.

Henandez, J., A. Jimenez, Mullineaux, P. & Sevilla, F. (2000). Tolerance of pea plants *(Pisum sativum)* to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Environ., 23*, 853-862.

Lichtenthaler, K.H. (1987). Chlorophylls and carotenoid : pigments of photosynthesis biomembranes. *Annual Review of Plant Physiology. 26,* 351-383.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Far, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Biological Chemistry., 193*, 265-275.

Mozafar, S., Mahlagha, G. & Hassan, E. (2007). Improved growth of salinity-stress soybean after inoculation with salt pre-treated mycorrhizal fungi. *Journal of Plant Physiology*., *164*, 1144-1151.

Munns, R. (2002). Comparative physiology of salf and water stress. *Plant Cell and Environment. 25*, 239-250.

Ramana, G.V., Padhy, S. P. & Chaitanya, K.V. (2012*).* Differential responses of four soybean (Glycine max L.) cultivars to salinity stress. *Legume Res., 35*(3), 185–193.

Rejeb, K. B., C. Abdelly & A. Savoure, (2014). How reactive oxygen species and proline face stress together. *Plant Physiology and Biochemistry, 80,* 278-284.

Smirnoff, N. (1993). The role of active oxygen species in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol*., *125,* 27-58.

Smirnoff, N. (1995). *Environment and Plant Metabolism*. BIOS Scientific, Oxford.

Sunohara, Y. & Matsumoto, H. (2004). Oxidative injury induced by the herbicide quinclorac on Echinochloa oryzicola Vasing. and the involvement of antioxidative ability in its highlyselective action in grass species. *Plant Science., 167*, 597-606.

Takemura, T., Hanagata, N., Sugihara, K., Baba, S., Karube, I. & Dubinsky, Z. (2000). Physiological and biochemical responses to salt stress in the mangrove, *Bruguiera gymnorrhiza. Aquat. Bot., 68*, 15-28.

Whiting, D., Card, A. & Wilson, C. (2010). *Saline Soils.* USA: Colorado State University Extension.

Yordanova, R.Y. (2004). Antioxidative enzymes in barley plants subjected to soil flooding. *Environ Exp Bot,. 51*, 93-101.

Zhang, L. & Becker, D. F. (2015). Connecting proline metabolism and signaling pathways in plant*. Frontiers Plant Science, 6*, 552-559.